



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Efecto del NaCl sobre la actividad fotosintética y  
respiratoria de *Vigna radiata*, Fabaceae

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

FÉLIX VEGA DE LUNA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. HUGO V. PERALES VELA

UNIDAD DE MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO. 2014





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## *Agradecimientos*

A la persona y memoria del Doctor Sergio González Moreno, quien en su momento depositó una gota de confianza en mí y me permitió ingresar a su laboratorio. Su alta calidad académica es una referencia que dirige vocaciones, no menos la mía.

Al Doctor Hugo V. Perales Vela, no existen suficientes palabras para agradecerle todo el apoyo que me ha brindado desde el momento en que, sin conocerme, me adoptó como alumno en el laboratorio. Lo que he aprendido de usted es un tesoro que ha cambiado mi forma de ver la vida.

A la Doctora Martha Ofelia Salcedo Álvarez, por su ayuda siempre sin interés, pero siempre preocupada por el desarrollo académico.

A los profesores que he conocido durante este tiempo, y de quienes su espíritu universitario fomenta día a día en mí el aprendizaje.

A mi familia, las personas que tienen un cariño muy especial hacia mi persona, pues han empujado todas las circunstancias hasta este momento.

A Nohemí Hannali Bermúdez Álvarez, te agradezco profundamente compartir esta fase de mi vida, apoyarme incondicionalmente y permitirnos crecer juntos.

Muchas gracias a las becas otorgadas por el Estado para la realización, continuación y conclusión de mis estudios de licenciatura.

## Contenido

Introducción.....	1
Antecedentes .....	2
i) Mecanismo de detección de iones .....	2
ii) Mecanismos de tolerancia .....	4
iii) Efectos generales de la salinidad .....	5
iv) Efectos de la salinidad sobre la respiración y fotosíntesis .....	5
v) Efectos de la salinidad sobre los eventos fotoquímicos de la fotosíntesis .....	7
vi) La fluorescencia de la clorofila a en el estudio de la fotosíntesis .....	8
vii) Modelo biológico.....	15
Objetivos .....	16
Objetivo General .....	16
Objetivos Particulares .....	16
Materiales y métodos .....	17
Protocolo experimental.....	17
Obtención de material vegetal.....	17
Tratamiento con NaCl. ....	17
Evaluación del crecimiento.....	17
Medición de la concentración de clorofilas y carotenoides totales .....	18
Ensayo de Fotosíntesis .....	18
Liberación de oxígeno .....	18
Medición del transporte electrónico en membranas tilacoidales aisladas .....	18
Medición de la emisión de Fluorescencia de la clorofila a .....	19
Medición de fluorescencia modulada .....	22
Ensayo de Respiración .....	22
Medición de consumo de oxígeno en hojas.....	22
Obtención de mitocondrias de raíz.....	22

Cuantificación de iones .....	23
Cuantificación de osmolitos compatibles .....	23
Tratamiento estadístico .....	24
Resultados y análisis.....	25
Efecto del NaCl sobre el Crecimiento .....	26
Elongación de órganos vegetales .....	26
Evaluación del Peso seco .....	29
Efecto del NaCl sobre el contenido iónico .....	33
Efecto del NaCl sobre el contenido de osmolitos compatibles.....	43
Efecto del NaCl sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos.....	45
Efecto del NaCl sobre la respiración .....	49
Efecto del NaCl sobre la respiración en raíces .....	49
Efecto del NaCl sobre la respiración en hojas .....	51
Efecto del NaCl sobre la fotosíntesis.....	53
Efecto del NaCl sobre la tasa de liberación de oxígeno.....	53
Efecto del NaCl sobre el transporte de electrones en tilacoides aislados .....	54
Efecto del NaCl sobre la utilización energética en muestras acondicionadas a la luz..	55
Efecto del NaCl sobre la estructura del fotosistema dos.....	58
Conclusiones.....	72
Bibliografía .....	73
Apéndice .....	85
Solución nutritiva Hoagland.....	85

## Índice de Figuras

Figura 1.	Fenómeno de absorción y disipación de energía lumínica por parte de la clorofila <i>a</i> en los estados excitados S1 y S2.....	9
Figura 2.	Efecto del estado de los centros de reacción sobre la intensidad de la señal de fluorescencia de la clorofila <i>a</i> .....	10
Figura 3.	Efecto Kautsky de la emisión de fluorescencia de la clorofila <i>a</i> .....	11
Figura 4.	Modelo de flujos energéticos en un sistema fotosintético de organismos eucariontes.....	12
Figura 5.	Protocolo para el análisis del decaimiento de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> mediante pulsos de luz modulada.....	14
Figura 6.	Efecto del NaCl sobre el tamaño de plántulas de <i>Vigna radiata</i> luego de siete días de exposición.....	25
Figura 7.	Efecto de la salinidad sobre la longitud de raíz, tallo y área foliar.....	28
Figura 8.	Efecto del tratamiento de NaCl sobre la biomasa de raíz, tallo y hoja.....	30
Figura 9.	Efecto de la salinidad sobre la relación del peso seco y la longitud de raíz, tallo y área foliar.....	30
Figura 10.	Efecto de la salinidad sobre la Tasa de Crecimiento Relativo.....	31
Figura 11.	Efecto de la salinidad sobre el contenido de Na <sup>+</sup> en raíz, tallo y hoja.....	36
Figura 12.	Efecto de la salinidad sobre la cantidad de iones por planta.....	37
Figura 13.	Efecto de la salinidad sobre la cantidad de iones por unidad de biomasa.....	38
Figura 14.	Distribución porcentual de los iones Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> y P en raíz, tallo y hoja.....	40
Figura 15.	Efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de NaCl sobre la relación [Na <sup>+</sup> ]/[K <sup>+</sup> ].....	41
Figura 16.	Efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de NaCl sobre la relación [Na <sup>+</sup> ]/[Ca <sup>2+</sup> ] y [Ca <sup>2+</sup> ]/[Mg <sup>2+</sup> ].....	42
Figura 17.	Efecto de la salinidad sobre el contenido de prolina en raíz, tallo y hoja.....	44
Figura 18.	Contenido de azúcares reductores presentes en hoja y raíz.....	45
Figura 19.	Efecto de la salinidad sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos por unidad de área foliar.....	46
Figura 20.	Efecto de la salinidad sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos por unidad de biomasa foliar.....	47
Figura 21.	Efecto de la salinidad sobre la variación porcentual de clorofila <i>a</i> y <i>b</i> .....	48
Figura 22.	Tasa de liberación de oxígeno en mitocondrias aisladas de raíces.....	50
Figura 23.	Efecto del NaCl sobre la velocidad de producción y consumo de oxígeno en hojas.....	52
Figura 24.	Efecto de la salinidad sobre el transporte electrónico entre las unidades de fotosistema dos y uno en membranas tilacoidales aisladas.....	54
Figura 25.	Efecto de la salinidad sobre la relación entre el potencial fotoquímico, el rendimiento cuántico máximo y la eficiencia cuántica operativa del fotosistema dos.....	57
Figura 26.	Efecto del tratamiento de NaCl sobre el incremento transitorio de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> .....	59
Figura 27.	Efecto de la salinización sobre la dinámica de emisión de fluorescencia normalizada entre los puntos O y P.....	61

Figura 28. Efecto de la salinidad sobre el incremento inicial de la curva polifásica de la clorofila <i>a</i> .....	63
Figura 29. Diferencias en fluorescencia variable sobre las bandas afectadas durante los tratamientos con NaCl.....	64
Figura 30. Efecto de la salinidad sobre la Banda L del incremento polifásico de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> .....	65
Figura 31. Efecto de la salinidad sobre la relación entre la fluorescencia variable relativa y la fracción de centros de reacción con QA reducida.....	66
Figura 32. Banda IP normalizada entre las fases IP.....	68
Figura 33. Efecto de la salinidad sobre el índice de rendimiento total.....	70

## Índice de Tablas

Tabla 1. Definición de los parámetros utilizados en el análisis JIP de la cinética polifásica de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> .....	20
Tabla 2. Efecto del NaCl sobre la longitud de raíz, tallo y hoja.....	27
Tabla 3. Contenido iónico en raíces de <i>Vigna radiata</i> sometidas a diferentes concentraciones de NaCl.....	34
Tabla 4. Contenido iónico en tallos de <i>Vigna radiata</i> sometidas a diferentes concentraciones de NaCl.....	35
Tabla 5. Contenido iónico en hojas de <i>Vigna radiata</i> sometidas a diferentes concentraciones de NaCl.....	35
Tabla 6. Parámetros de fluorescencia modulada.....	55
Tabla 7. Parámetros energéticos obtenidos a partir del análisis del decaimiento de la emisión de fluorescencia de la clorofila <i>a</i> .....	56
Tabla 8. Efecto de la salinidad sobre los niveles de fluorescencia instantánea.....	60
Tabla 9. Efecto del tratamiento con NaCl sobre parámetros estructurales obtenidos a partir de la emisión de fluorescencia de la clorofila <i>a</i> .....	62
Tabla 10. Flujos energéticos específicos calculados de acuerdo al modelo de biomembranas.....	68
Tabla 11. Rendimientos energéticos calculados de acuerdo al modelo de biomembranas.....	69
Tabla 12. Efecto de la salinidad sobre los componentes del índice de rendimiento.....	70

## Abreviaturas

NaCl	Cloruro de sodio
PSII	Fotosistema dos (agua-plastoquinona oxidorreductasa impulsada por luz)
PSI	Fotosistema uno (plastocianina-ferredoxina oxidorreductasa impulsada por luz)
CLO	Complejo liberador de oxígeno
$\text{dSm}^{-1}$	Decisiemens por metro
RC	Centro de reacción
$\text{Na}^+$	Ión sodio
$\text{Cl}^-$	Ión cloruro
HKT	Transportador de potasio de alta afinidad
QA	Primer aceptor estable del fotosistema dos
QB	Segundo aceptor estable del fotosistema dos
ABS	Absorción de energía en las antenas del fotosistema dos
TR	Atrapamiento de excitones en el centro de reacción del fotosistema dos
ET	Transporte electrónico en los intermediarios de la cadena fotosintética
ETR	Tasa de transporte electrónico del fotosistema dos
NAD(H)	Nicotina adenina dinucleótido (reducida)
NADP(H)	Nicotina adenina dinucleótido fosfato (reducida)
JIP	Prueba matemática para el análisis de la fluorescencia polifásica



## Resumen

La salinidad del suelo es un problema actual que se caracteriza por repercutir negativamente en la producción agrícola, y se origina natural o antropogénicamente en distintas regiones del mundo. El principal compuesto de los sistemas salinos más estudiados es el  $\text{Na}^+$ , que resulta tóxico tanto por su alta concentración como por su falta de función en el metabolismo vegetal, puesto que la mayoría de las plantas agrícolas exhiben daños cuando se crecen en medios con alto contenido de  $\text{NaCl}$ . Entre las principales afectaciones observadas se encuentra el retraso en el crecimiento, deficiencias nutrimentales y desbalance energético, que se relacionan con la forma en la que los iones de  $\text{Na}^+$  impactan en la actividad celular. Sin embargo, dichas afectaciones varían entre las distintas especies vegetales analizadas, de manera que aún no se tiene un consenso acerca del sitio de impacto del  $\text{Na}^+$  en el metabolismo celular.

En el presente trabajo se caracterizó el impacto que el  $\text{NaCl}$  tiene sobre la actividad fotoquímica de plantas de *Vigna radiata*. Se germinaron semillas de frijol mungo bajo condiciones controladas de temperatura y luz; tres días después los germinados se colocaron en charolas conteniendo solución nutritiva Hoagland. Cuando las plántulas cumplieron 10 días de vida, se sometieron a concentraciones de 50, 100 y 150 mM de  $\text{NaCl}$  durante siete días.

Los parámetros medidos indican que el  $\text{NaCl}$  tiene un impacto negativo sobre el crecimiento de las plántulas, tanto por la falta de acumulación de biomasa, como por el retraso en la aparición de hojas nuevas trifoliadas. Lo anterior repercutió en su tamaño, pues mostraron longitudes de tallo, raíz y áreas foliares menores con respecto al incremento de  $\text{NaCl}$ . El estudio de la distribución iónica demostró una modificación en la presencia de iones con respecto al peso seco. Frente a las distintas concentraciones de  $\text{NaCl}$  utilizadas, el  $\text{Na}^+$  tuvo un incremento exponencial en la raíz, que se atenuó hacia la parte aérea de la planta. Iones como el  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{P}$  mostraron modificaciones en concentración como efecto del tratamiento de  $\text{NaCl}$ , siendo el  $\text{Ca}^{2+}$  el que mostró una menor concentración en las hojas. La presencia de osmolitos, como prolina, en hoja, y azúcares reductores en raíz, presenta una tendencia de incremento con respecto a la concentración de  $\text{NaCl}$  utilizada.

La respiración de hojas resultó incrementada como efecto del  $\text{NaCl}$ . Existe una diferencia marcada cuando la medición se realiza durante el primer o segundo minuto de obscuridad; se plantea la posible participación de procesos fotorrespiratorios durante este fenómeno. Como efecto del  $\text{NaCl}$ , se observó un cambio en la relación estequiométrica de las clorofilas *a* y *b*, que tiene que ver con la estructura funcional de las antenas en los complejos de fotosistemas uno y dos. La salinidad provocó una menor producción de oxígeno en hojas, lo que podría estar relacionado con una

menor capacidad de transporte electrónico lineal en membranas tilacoidales aisladas. Analizando el registro de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a*, bajo condiciones de luz actínica, se observó que la salinidad induce una disminución en la eficiencia operativa máxima del fotosistema dos, provocando con ello una disminución en la tasa de transporte electrónico. Bajo una condición de aclimatación a la oscuridad, las plantas con 150 mM de NaCl alcanzan el 84 % de la capacidad máxima fotoquímica del fotosistema dos. Los cambios significativos en la función del fotosistema dos están localizados en el lado donador y aceptor de electrones.

## Introducción

La degradación de los suelos es un proceso estrechamente relacionado con el incremento de las actividades humanas para la satisfacción de la demanda de alimentos (Boyko, 1966). Este fenómeno se define como la reducción en la capacidad de la tierra para producir beneficios de uso particular bajo una forma específica de manejo (FAO, 1999). De acuerdo a la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT, 2012) este problema se debe a cuatro principales procesos: la erosión hídrica y eólica y la degradación física y química; ésta última se categoriza en tipos como la disminución de la fertilidad del suelo, la contaminación, salinización – alcalinización, eutrofización, entre otros.

En la Norma Oficial Mexicana (NOM)-021-SEMARNAT-2000, se señala que la salinidad hace alusión a la concentración de sales en el perfil del suelo que puede afectar el crecimiento y desarrollo de los cultivos. Es decir, un suelo salino es aquel que contiene suficientes sales solubles como para reducir el crecimiento de las plantas y presenta una conductividad eléctrica en la pasta de saturación igual o mayor a  $4 \text{ dSm}^{-1}$  ( $\approx 40 \text{ mM NaCl}$ ); además, un suelo sódico es aquel en el cual el sodio intercambiable es de 15 % o más, o aquel que contiene el sodio suficiente como para afectar adversamente sus propiedades físicas.

Uno de los factores más severos de estrés abiótico en las plantas, resulta precisamente del proceso de salinización de los suelos. Se considera como una de las mayores causas de la degradación de tierras destinadas a la agricultura y de la pérdida en producción (Chen y Polle, 2010). Este fenómeno se presenta principalmente en zonas áridas, cuencas cerradas y en las zonas costeras, donde existen problemas con la calidad y cantidad del agua de riego y la capacidad del suelo para drenar líquidos, así como la constitución de cada tipo de suelo y las características de evaporación. La distribución de estos suelos salinos contempla la llegada y acumulo de sales donde antes no las habían, debido a ello se pueden encontrar en diversas regiones climáticas y altitudinales (Carillo *et al.*, 2011). Las consecuencias finales son la acumulación de sales, principalmente básicas (cloruros, sulfatos y carbonatos de sodio, magnesio y calcio) con pH altos, que proporcionan al suelo una característica típicamente tóxica y una disminución en su potencial hídrico (US Salinity Laboratory, 1969).

Las causas por las cuales un suelo se vuelve salino pueden ser procesos naturales (primarios) o antropogénicos (secundarios). De acuerdo al *Land and Plant Nutrition Management Service* de la FAO, más del 6 % de la superficie terrestre continental está afectada por cualquier tipo de salinidad o sodicidad. De las 1500 millones de hectáreas de tierra cultivadas en el mundo, aproximadamente 32 millones (2 %) son afectadas por algún grado de salinidad secundaria

([www.plantstress.com/Articles/index.asp](http://www.plantstress.com/Articles/index.asp)). En México, según datos de la SEMARNAT (INEGI, 2012), en 2008 la fracción de suelos con algún tipo de degradación química fue de 34 millones de hectáreas, de éstas, el 3.2 % presentó problemas de salinización.

Considerando que el estrés es un factor que perturba o puede perturbar el funcionamiento fisiológico normal de un organismo y limitar su desarrollo y su reproducción por debajo del potencial genético, la salinidad se ha vuelto una amenaza para la agricultura. Se ha predicho que éste llegará a ser uno de los grandes problemas en las próximas décadas (<http://www.fao.org/docrep/004/y3557s/y3557s11.htm>; <http://geografia.fcsh.unl.pt/lucinda/>), ya que los efectos suelen intensificarse dependiendo de la concentración y acumulo de las sales y de la capacidad y respuesta fisiológica adaptativa de cada especie (Osmond *et al.*, 1987; Muns y Tester, 2008). Entre los distintos procesos metabólicos perturbados durante el estrés abiótico, la fotosíntesis y respiración presentan una importancia vital para el desarrollo y sobrevivencia de cualquier organismo ya que regulan la energía demandada para cualquier actividad a nivel celular. Una caracterización del efecto de la salinidad sobre la actividad respiratoria y la actividad de la maquinaria fotosintética permite conocer la condición del sistema bajo dicho estrés ambiental. Por lo anterior, el estudio y comprensión de las relaciones energéticas daría pie para el mejoramiento de cultivos de importancia alimenticia bajo un panorama creciente de suelos en procesos de deterioro.

## **Antecedentes**

### *i) Mecanismo de detección de iones*

Se reconoce que a pesar de que las formas iónicas presentes en los suelos salinos son diversas, pudiendo ser cationes como sodio, calcio y magnesio, y aniones como cloruro, sulfato y carbonato, los componentes mayoritarios en los sistemas salinos suelen ser sodio y cloruro (Rengasamy, 2010). Por tanto, debido a que el compuesto salino más abundante en el suelo es el NaCl, en las plantas se hallan mecanismos para regular la entrada, acumulación y/o exclusión de Na<sup>+</sup>. Su detección extracelular es un proceso clave en el desarrollo de la tolerancia a la salinidad, puesto que pone en marcha los mecanismos que realizan su compartimentación, tanto a nivel celular como de tejidos (Türkan y Demiral, 2009).

Es importante mencionar que cada tipo de ión, Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>, presenta efectos individuales y característicos por separado, sin embargo estos efectos pueden ser aditivos cuando están juntos (Tavakkoli *et al.*, 2011). Al presentarse este tipo de salinidad, existe una alteración en el interior celular pues se crean movimientos iónicos dependientes de concentraciones y de carga para los iones derivados de la sal, lo que conduce a una alteración en el potencial de membrana. Los

consecuentes problemas nutrimentales son debidos principalmente a que la saturación iónica favorece la pérdida de iones muy importantes, como el  $K^+$  o  $NO_3^-$  (Teakle y Tyerman, 2010).

El  $Na^+$  es el ión estudiado en mayor medida ya que se relaciona principalmente con la alteración en la relación  $Na^+/K^+$ , importante para el mantenimiento del potencial de membrana. Se postula que es detectado por un antiportador  $Na^+/H^+$  en la membrana plasmática y por enzimas sensibles a  $Na^+$  en el citoplasma, además de diversas proteínas llamadas SOS (*Salt-Overly-Sensitive*) que desencadenan señales moleculares como síntesis de ácido abscísico o regulación de canales de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ , para después canalizar al  $Na^+$  hacia la vacuola (Türkan y Demiral, 2009).

El  $Cl^-$ , menos considerado en la mayoría de estudios de distribución iónica en plantas bajo salinidad, tiene una relación de manera inversa con la tasa de crecimiento y con la tolerancia al estrés (Teakle y Tyerman, 2010). Se sabe que se puede excluir a nivel extracelular, alojándolo en la epidermis, preferencialmente de raíces, o reteniéndolo intracelularmente en la vacuola; aunque también se han detectado cantidades apreciables en citoplasma. Cuando existe una alta concentración de  $Cl^-$  en el ambiente extracelular, el transporte de  $Cl^-$  hacia la planta se realiza de manera pasiva, pero de manera activa en el interior. Lo anterior implica gasto energético para el flujo hacia el exterior, no así para el flujo hacia el interior (Teakle y Tyerman, 2010).

Los iones de  $Na^+$  y  $Cl^-$  del substrato se distribuyen en las plantas librando diversas barreras físicas: la capa epidérmica junto con la corteza y sus vacuolas, las células estelares delimitadas por la banda de caspari, y el tejido vascular, xilema y floema (Fernández *et al.*, 2008).

En presencia de concentraciones bajas de  $Cl^-$  en el medio, la adquisición de este ión por las células, es un proceso activo relacionado directamente con la formación de un gradiente de pH a través de simportadores  $H^+/Cl^-$  o de antiportadores energizados por ATP (Kafkafi *et al.*, 2001).

Por su parte, la entrada de  $Na^+$  a las células es pasiva y se piensa que se realiza a través de transportadores tipo uniportador o canales de iones, entre ellos transportadores de alta afinidad para potasio (*High-affinity K transporter*, HKT), transportadores de cationes de baja afinidad (*Low Cation Transporter*, LCT1) y canales no selectivos a cationes (*Nonselective Cation Channels*, NSCC; Apse y Blumwald, 2007; Rus *et al.*, 2001). Se ha postulado que HKT es uno de los transportadores más importantes para la tolerancia a la salinidad en *Arabidopsis thaliana* así como en monocotiledóneas (Horie *et al.*, 2009), debido a que está implicado en la selección de iones de  $K^+$  así como en la exclusión de iones  $Na^+$  hacia el tejido vascular.

## ii) Mecanismos de tolerancia

Dependiendo de su historia evolutiva, en las plantas, por su característica sésil, se han desarrollado diversos mecanismos para enfrentar la presencia de sales en el suelo. Es importante considerar que distintos sistemas salinos presentan variables características (como la temperatura, la presión osmótica, la humedad relativa o la cantidad y calidad de luz) que podrían influir en la expresión de una determinada característica adaptativa de las plantas (Carillo *et al.*, 2011; Orcutt y Nilsen, 2000).

Las plantas se suelen dividir en halófitas, por su habilidad para crecer y completar su ciclo de vida en un substrato salino (regularmente alrededor de 200 mM de NaCl), o en plantas glicófitas, que no toleran altas concentraciones de sal mayores a 50 mM de NaCl (Flowers *et al.*, 1977).

Típicamente se habla de dos procesos importantes para evitar la presencia de  $\text{Na}^+$  o  $\text{Cl}^-$  en el citoplasma, uno es la compartimentación y otro la exclusión de estos iones potencialmente tóxicos (Jacoby, 1999). Para llevar a cabo esto se han descrito, en especies de interés agrícola, estrategias como el mejoramiento de la selectividad iónica o la limitación en el consumo de iones tóxicos, la acumulación preferente de iones en vacuolas, compartimentos intersticiales, tallos y hojas viejas, el ajuste osmótico, la inducción de solutos orgánicos y el mejoramiento en la eficiencia del uso de agua (Shannon, 1997).

A lo largo de la diversidad biológica vegetal, sin embargo, se puede encontrar una variedad más amplia de mecanismos de adaptación a la salinidad. Orcutt y Nilsen (2000) señalan que estos mecanismos consisten de la exclusión (homeostasis de iones), la reabsorción y retranslocación, la extrusión a través de glándulas y vesículas, la dilución por succulencia, compartimentación, e inducción del metabolismo ácido de las crasuláceas (en halófitas extremas como *Mesembryanthemum crystallinum*).

Se dice que en su mayoría, tanto las plantas glicofitas como halofitas utilizan estrategias similares para regular la concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular (Rus *et al.*, 2001). Por ello la diferencia principal entre las plantas tolerantes y sensibles a salinidad, consiste principalmente en su capacidad de mantener concentraciones bajas de  $\text{Na}^+$  en el citoplasma o evitar su entrada, haciendo uso de enzimas más específicas para los nutrimentos.

Las afectaciones observadas en los cultivos vegetales, debidas a la salinidad, no son respuestas comunes o constantes entre distintos grupos de organismos. Por ello se ha dicho que es difícil enunciar alguna característica que sea indicadora de la resistencia hacia este factor (Ashraf y Harris, 2004). Observaciones a partir de plantas tolerantes han permitido afirmar que la tolerancia

a la salinidad implica conjuntar tres aspectos interconectados: la detoxificación, la homeostasis iónica y la regulación del crecimiento (Zhu, 2001), lo que se logra a través de cambios en los patrones de la expresión génica para amortiguar el efecto osmótico y tóxico (Parida y Das, 2005).

### *iii) Efectos generales de la salinidad*

Cuando una planta es sometida a un medio salino, se pueden apreciar típicamente dos fases de impacto. En la primera, al inicio de la exposición, las altas concentraciones de sales en el suelo dificultan a la raíz la obtención de nutrimentos y agua (estrés osmótico), retardando el crecimiento al modificarse la actividad metabólica de procesos importantes, como la división celular y la apertura estomática. En la segunda, las altas concentraciones de sal provocan en la planta un desbalance de iones (estrés iónico), generalmente por la acumulación excesiva en algunos tejidos debido a una exposición prolongada a la salinidad, pues se ven afectados procesos osmóticos, actividades enzimáticas y síntesis de macromoléculas generalmente (Carillo *et al.*, 2011; Muns y Tester, 2008; Parida y Das, 2005).

Es importante mencionar que la toxicidad que se presenta tras la exposición de plantas a medios donde el principal componente salino es el  $\text{Na}^+$ , se debe al hecho de que éste ion no es un nutrimento para éstas, ya que un elemento es esencial, o considerado como un nutrimento, si: 1) su deficiencia imposibilita a la planta completar la fase vegetativa o reproductiva de su ciclo de vida; 2) su deficiencia no puede ser evitada por otro nutrimento mineral; o 3) se ha demostrado una función específica (Arnon y Stout, 1939). Se ha discutido que el  $\text{Na}^+$ , por su similitud química, suele sustituir cationes monovalentes de importancia como el  $\text{K}^+$  (Wang *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha dicho que las plantas con metabolismo fotosintético C4 sí necesitan  $\text{Na}^+$  para crecer en condiciones óptimas. Aunque el sitio exacto en el cual el  $\text{Na}^+$  participa no se ha dilucidado, se sabe que está involucrado en la conversión de piruvato a fosfoenolpiruvato, para el transporte de carbono intercelular (Lastra, 2010). Sin embargo, la concentración de sal que requieren estas plantas es baja, de manera que las altas concentraciones también afectan su productividad, aunque en menor magnitud que a las plantas C3 (Gramer, 2004).

### *iv) Efectos de la salinidad sobre la respiración y fotosíntesis*

Los procesos de respiración y fotosíntesis son primordiales para la regulación energética en organismos fotoautótrofos, y en las plantas se encuentran compartimentalizados en los organelos celulares mitocondrias y cloroplastos, respectivamente. En los tejidos fotosintéticos, estos procesos mantienen una estrecha relación para balancear los equivalentes reductores y la carga energética de la célula durante la asimilación de carbono y amonio (Raghavendra y Padmasree,

2003). Se deduce pues que alteraciones entre las rutas de señalización para estos dos procesos conducen a modificaciones en el balance redox general.

Bajo diversas condiciones de estrés, el transporte electrónico mitocondrial puede adoptar modificaciones metabólicas (Møller, 2001), lo que podría llevar a un exceso de electrones dentro de la cadena transportadora (Maxwell *et al.*, 1999). Dichos electrones pueden pasar anticipadamente al oxígeno molecular y generar problemas relacionados con el estrés oxidativo por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno, como radicales superóxido, hidroxilo y peróxido de hidrógeno, que pueden generar daño en estructuras moleculares (Sweetlove *et al.*, 2002).

En mitocondrias vegetales y de algunos otros grupos taxonómicos, como hongos, protozoarios y bacterias, se han descrito rutas no fosforilativas que permiten drenar la carga electrónica dentro de la cadena (Ferne *et al.*, 2004; Borecký y Vercesi, 2005). La ruta que permite tomar directamente los electrones del Ubiquinol y reducir una molécula de oxígeno es conocida como ruta alterna oxidativa, y es llevada a cabo por la proteína Oxidasa Alterna (AOX; EC 1.10.3.11), que brinda resistencia respiratoria al cianuro (Vanlerberghe y McIntosh, 1997). Esta ruta es de importancia por su capacidad de disipación de energía en forma de calor en algunas zonas de las plantas (Breidenbach *et al.*, 1997), y con una función protectora ante el daño oxidativo, en la que se involucra una gama de sistemas enzimáticos y no enzimáticos que permiten controlar dichas especies reactivas de oxígeno (Abogadallah, 2010). Actualmente se reconoce su función como protectora del aparato fotosintético, ya que puede actuar como sumidero de electrones generados por la fotosíntesis, especialmente de los equivalentes reductores (NAD(P)H) a través de sistemas de lanzaderas que comunican ambos organelos, cloroplasto y mitocondria (Yoshida *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012).

El llevar a cabo el secuestro o canalización de iones tóxicos supone un gasto energético importante para las plantas. De este modo, el manejo de la energía es sin duda uno de los problemas a los cuales éstas se enfrentan cuando están sometidas a este tipo de estrés, puesto que abatir o evitar dicho factor supone ponderar dichas actividades a la par de los procesos basales de mantenimiento. Se sabe que la respiración mitocondrial contribuye a la resistencia frente al estrés salino, ya que para realizar la exclusión y compartimentación, los transportadores de iones son dependientes de ATP. En su revisión, Jacoby *et al.* (2011) consideran que para entender mejor el problema habría de analizarse la relación de carbono fijado y nitrógeno total en conjunto con la disminución en la tasa de crecimiento en condiciones de estrés, puesto que del 25 al 60 % de CO<sub>2</sub> fijado se puede perder a lo largo del día a través de la respiración. Estos autores también consideran importante conocer las tasas respiratorias y el control que éstas pudieran



presentar sobre el balance energético general, ya que las plantas más tolerantes a la salinidad asignan menos carbono fijado a la respiración, lo que permite su crecimiento.

Como ya se mencionó, el comienzo de la salinización en una planta presenta un efecto osmótico importante. Se sabe que bajo estas condiciones, igual que en deficiencia de agua, se presenta un problema de déficit hídrico fisiológico, que enmarca la afectación al crecimiento por la disminución de la conductancia estomática (Chaves *et al.*, 2009). Flexas *et al.* (2004) señalan que esta disminución en el crecimiento se debe más bien a una difusión deficiente de CO<sub>2</sub> hacia las células del mesófilo, más que a la capacidad bioquímica de asimilación.

#### v) Efectos de la salinidad sobre los eventos fotoquímicos de la fotosíntesis

Durante las últimas décadas, la comprensión de la fotosíntesis se ha tornado interesante debido al desarrollo de técnicas para el estudio del transporte electrónico tilacoidal en condiciones *in vivo*. Estas se basan en el análisis del fenómeno de emisión de fluorescencia de la clorofila *a*, que da cuenta de la forma en cómo se utiliza la energía que absorben las moléculas de clorofila una vez que se excitan con luz actínica. Estos avances han permitido conocer las relaciones energéticas a nivel de membranas fotosintéticas.

Un desbalance entre la fijación de CO<sub>2</sub> respecto a la absorción de luz por los complejos fotosintéticos conducen a modificaciones subsecuentes en éstos. Se sabe que la salinidad afecta el contenido de clorofilas y la proporción de las clorofilas presentes en los complejos fotosintéticos (clorofila *a* y *b*), lo que influye de manera significativa en la eficiencia de conversión de energía (Dajic, 2006). De tal manera que para mantener un flujo electrónico estable a nivel de los sistemas colectores de luz, la disipación de una fracción de esa energía en forma de calor, es un proceso muy importante para impedir el fotodaño (Perales, 2001).

Según Murata *et al.*, (2007) la salinidad provoca un efecto fotoinhibitorio debido primordialmente a la inhibición en la síntesis de proteínas, más que al fotodaño en los centros de reacción de los complejos fotosintéticos. En otras palabras este fenómeno es atribuible a una afectación a nivel de traducción en el flujo de la información genética, en primer lugar, más que la consecuencia de la saturación en la cadena fotosintética de transporte de electrones. El modelo para explicar este fenómeno está dado por dos pasos, la inactivación del complejo liberador de oxígeno y el consiguiente acumulo de centros de reacción dañados (Takahashi y Murata, 2008).

En un estudio con hojas de trigo (*Triticum aestivum*) en 2010, Mehta *et al.* Encontraron que un incremento en el NaCl provoca una inhibición del flujo de electrones en el lado donador del fotosistema dos y un decremento de los intermediarios de la cadena transportadora. El mismo

estudio mostró una conversión significativa de centros de reacción activos  $\alpha$  (centros de reacción reductores de  $Q_A$  localizados en la zona apilada tilacoidal) a centros inactivos  $\beta$  y  $\gamma$  (centros no reductores de  $Q_A$  localizados en la zona estromal tilacoidal con una antena más pequeña que los  $\alpha$  y los  $\beta$  respectivamente).

La respuesta fotosintética puede variar, también, de acuerdo a la concentración de sal y al tiempo de exposición. En el experimento de Zaghdoudi *et al.* (2011) incrementaron la concentración de sal en el tiempo en plantas de *Trigonella foenum graecum*, hasta 150 mM en cinco días. Estos autores consideran que la actividad fotosintética potencial se mantuvo estable hasta 50 mM de NaCl en el segundo día y que los eventos más importantes que contribuyeron a la posterior fotoinhibición fueron el retraso en la reoxidación del primer aceptor estable de electrones ( $Q_A$ ) y el daño al fotosistema uno.

#### vi) La fluorescencia de la clorofila *a* en el estudio de la fotosíntesis

La medición de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* se ha convertido en una herramienta útil para analizar parámetros de eficiencia fotoquímica en membranas tilacoidales de organismos fotosintéticos oxigénicos (González *et al.*, 2008).

La fluorescencia de la clorofila *a* es un proceso que H. Kautsky y A. Hirsch relacionaron con la fotosíntesis en 1931. Estudios posteriores demostraron que este fenómeno es capaz de brindar una gran cantidad de información acerca de la estructura y función del aparato fotosintético, específicamente del fotosistema II (PSII) y del proceso de transporte de electrones a lo largo de la cadena embebida en las membranas tilacoidales; además, la fluorescencia de la clorofila *a* es una prueba no invasiva, rápida y altamente sensible (Govindjee, 1995). El fotosistema I (PSI) tiene una contribución mínima de emisión de fluorescencia frente al total registrado a temperatura ambiente, por lo que la mayoría de los protocolos utilizados para medir la fluorescencia de la clorofila *a* lo consideran despreciable (Pfündel *et al.*, 2013).

En una muestra de clorofila *a* disuelta en acetona, el proceso físico de la fluorescencia es resultado de la energización a partir de la absorción de la energía lumínica. Dicho proceso consiste en la emisión de energía electromagnética (fotones) desde un estado excitado S1 hasta un estado basal S0 de la molécula (Figura 1). Además, dicha emisión tiene una longitud de onda mayor (685 nm) que aquella que excita a la molécula de clorofila, por lo que puede ser discriminada y medida con relativa facilidad.

Dentro de los complejos proteicos tilacoidales, las moléculas de clorofila, luego de ser excitadas, se pueden relajar mediante tres procesos: 1) Liberación de calor, 2) emisión de fluorescencia y 3)

transferencia de energía por resonancia inductiva (transferencia de excitones) o separación de cargas, es decir, la utilización fotoquímica de la energía (Figura 1). Éstos procesos compiten entre sí a través de sus constantes de velocidad y ambiente redox, lo que significa que se modifican proporcionalmente de acuerdo a la forma en que es utilizada la energía. Estudios más finos han indicado que el porcentaje de energía que se libera como fluorescencia se encuentra entre el 0.5 al 7 % de la energía absorbida, dependiendo si predomina la separación de cargas o la liberación como calor respectivamente. En otras palabras, la utilización fotoquímica de la energía resulta inversamente proporcional a los otros dos procesos.

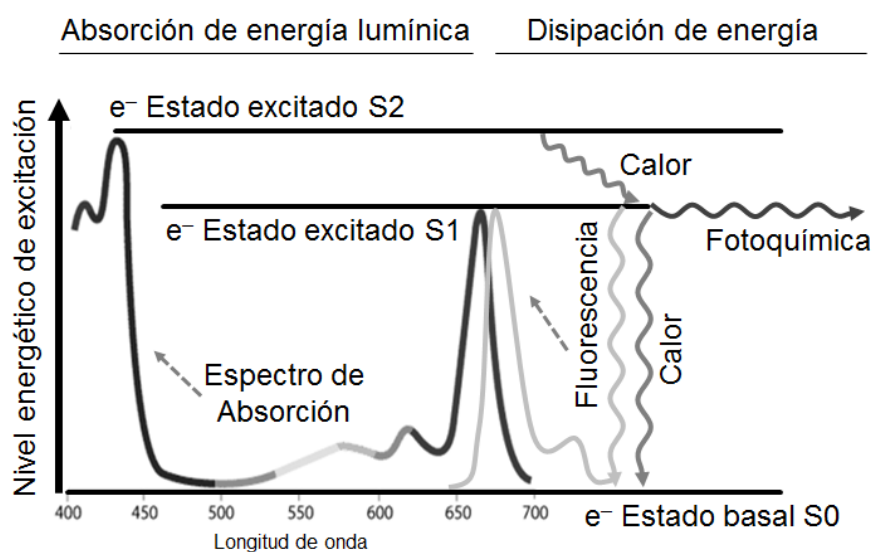


Figura 1. Fenómeno de absorción de energía lumínica por parte de la clorofila *a* y rutas de disipación energética a partir de los estados excitados S1 y S2 de un electrón posterior a la absorción de luz por parte de la molécula de clorofila *a*.

En el ámbito metodológico se han desarrollado dos técnicas para estudiar la cinética de emisión de fluorescencia que arroja información del fenómeno fotosintético. La primera, conocida como fluorescencia lenta o modulada, se basa en la aplicación de pulsos de luz en muestras con una condición de luz actínica dada y permite el estudio de la utilización energética, especialmente para estudios acerca del decaimiento fotoquímico y no fotoquímico. La segunda, técnica llamada fluorescencia rápida o polifásica, consiste en la aplicación de un pulso único de luz saturante en muestras preacondicionadas a la obscuridad, que permite estudiar los flujos energéticos desde el arranque del transporte electrónico fotosintético y hasta un segundo después.

#### vi.1) La prueba JIP

Al observar un trazo de fluorescencia es esencial tener presente dos cosas: primero, que la señal de fluorescencia proviene únicamente de la clorofila *a*, y segundo, que el nivel del registro de la

señal indica el estado en que se encuentran los centros de reacción. Cuando se habla de un centro de reacción abierto, significa que éste es capaz de aceptar energía para realizar la separación de cargas, mientras que un centro de reacción cerrado es aquel que ha absorbido energía y no puede aceptar más hasta que recupere su electrón por la oxidación del agua o regrese a su estado basal (Figura 2). Con lo anterior se puede afirmar que si a una muestra fotosintética adaptada a la oscuridad se le aplica un pulso de luz intenso pero breve, se inducirá el cierre momentáneo de los centros de reacción.

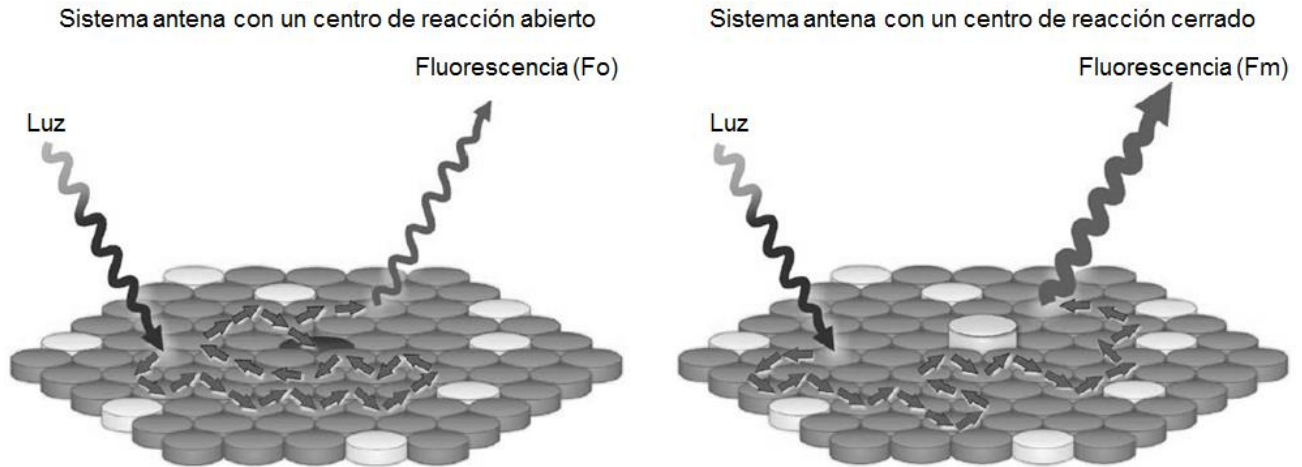


Figura 2. Efecto del estado de los centros de reacción sobre la intensidad de la señal de fluorescencia de la clorofila *a*. Se representa el sistema de antenas del aparato fotosintético como cilindros color gris que presentan el fenómeno de transferencia por resonancia inductiva de excitones durante la absorción de luz. El centro de reacción se representa al centro de la imagen como un cilindro oscuro cuando está abierto, y como un cilindro gris claro y elevado respecto del plano de las antenas, cuando está cerrado y no puede absorber más excitones. Por cuestiones ilustrativas, sólo se indica la fracción de energía disipada como fluorescencia y no la disipada como calor. Fo: fluorescencia mínima, Fm: fluorescencia máxima (Tomado de Govindjee, 2010).

Cuando una muestra fotosintética acondicionada a la oscuridad se irradia con una luz intensa, se observa un incremento instantáneo en la emisión de fluorescencia de la clorofila *a*, que comienza a disminuir luego de algunos segundos (Figura 3A). Con una mayor resolución de tiempo, durante dicho incremento se revelan cuatro inflexiones que se presentan en intervalos de tiempo característicos (Figura 3B): la primera llamada O, es la señal de fluorescencia mínima al inicio del registro (50  $\mu$ s) e indica que todos los centros de reacción se encuentran abiertos; la segunda, llamada J (2 ms), está relacionada a la reducción momentánea de la poza de quinonas A (QA); la tercera, llamada I (20 ms), se relaciona a la reducción momentánea de la poza de QA y quinonas B

(QB); y la cuarta, llamada P (aproximadamente a los 300 ms), es el punto máximo de fluorescencia, cuando todos los componentes de la cadena, y por lo tanto los centros de reacción, se encuentran reducidos (Figura 3C).

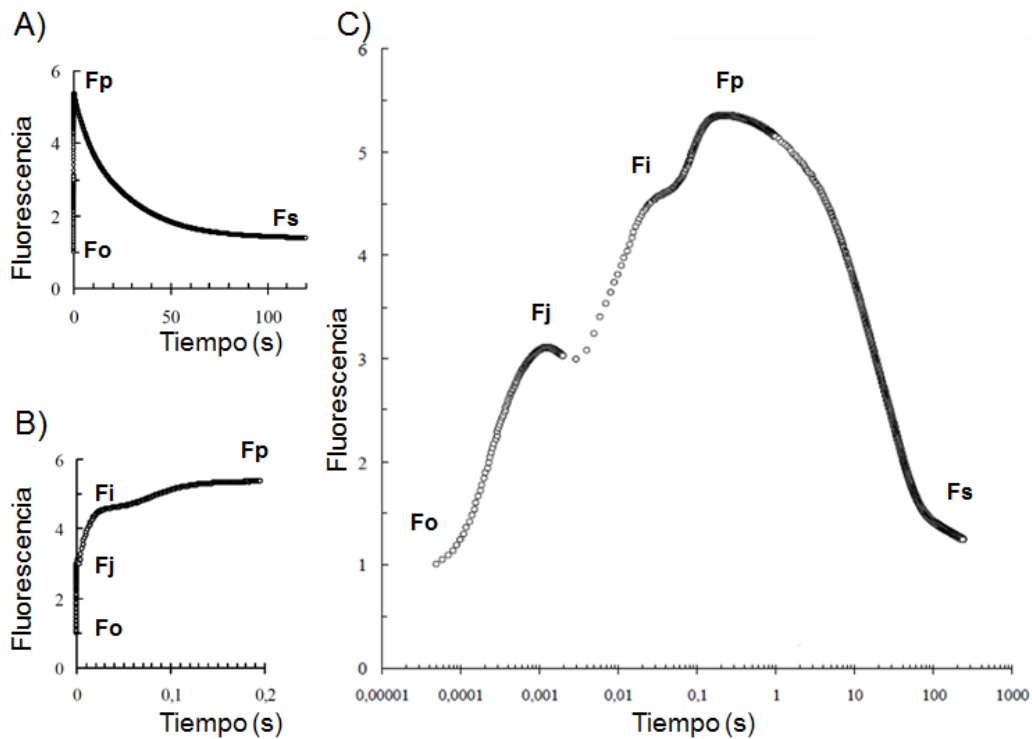


Figura 3. Efecto Kautsky de la emisión de fluorescencia de la clorofila a. A) Incremento en la emisión de fluorescencia cuando una muestra acondicionada a la obscuridad se irradia con luz actínica intensa. B) Ampliación del incremento instantáneo de la emisión de fluorescencia durante los primeros 0.2 s. C) Registro de la emisión de fluorescencia graficado en tiempo logarítmico. En cada gráfica se indica el nombre de la inflexión observada con una mayor resolución de tiempo durante el registro. Las unidades de fluorescencia son relativas al valor de  $F_o$ .

A partir de relaciones matemáticas, se ha desarrollado un modelo de flujos de energía en biomembranas que relaciona diversos parámetros de la cinética polifásica. Éste considera que la energía que llega a las antenas es absorbida (ABS), luego atrapada por los centros de reacción (TR) o disipada como calor (DI), y luego transportada por los demás componentes de la cadena (ET; Figura 4) a partir del primer aceptor de electrones estable ( $Q_A$ ). Cuando estos flujos energéticos son referidos a los centros de reacción (RC) se conocen como flujos específicos de energía. Sin embargo, también es posible expresar los flujos energéticos como rendimientos

cuánticos ( $\phi$ ), considerando que el rendimiento energético se obtiene de la proporción de energía utilizada en algún proceso en relación a la energía total que ingresó al sistema; es decir, la ABS.

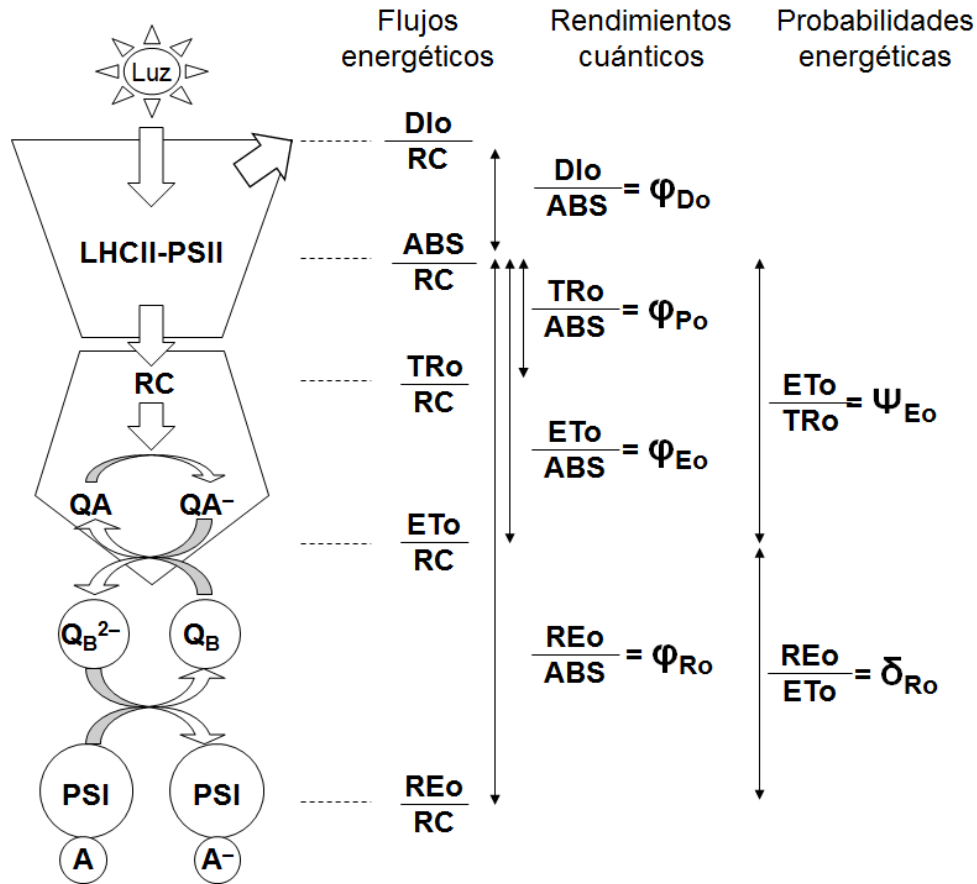


Figura 4. Modelo de flujos energéticos en un sistema fotosintético de organismos eucariontes. El esquema con figuras geométricas de la izquierda indica la ruta que la energía de la luz sigue una vez que fue absorbida por el sistema antena (LHCII-PSII). Una fracción es disipada como calor, y otra es transferida a los centros de reacción (RC) para la reducción del primer aceptor de electrones (QA). La energía contenida en la transferencia electrónica llega a los acarreadores intermedios (QB) y luego de pasar por el complejo de citocromo  $b_6f$  y la plastocianina (no mostrados), llegan al fotosistema uno (PSI) que dona los electrones a los aceptores finales ferredoxina y  $NADP^+$  (A). Se indica con líneas punteadas los sitios considerados para los flujos energéticos por centro de reacción. Las flechas verticales muestran la relación de los flujos energéticos con los rendimientos cuánticos y las probabilidades energéticas. ABS: absorción de luz, DI: disipación energética, TR: atrapamiento de excitones, ET: transporte electrónico, RE: reducción de aceptores finales. El subíndice "o" indica que

el parámetro se obtiene a partir del tiempo cero en el paso de la obscuridad a la luz, o utilizando como base el valor de  $F_0$ .

En base a lo anterior, la eficiencia cuántica máxima para la fotoquímica primaria ( $\phi_{Po}$ ) hace referencia a la energía que fue atrapada en los centros de reacción del total de energía absorbida (TR/ABS). El producto cuántico máximo de disipación energética como calor ( $\phi_{Do}$ ) indica el flujo de energía disipada respecto a la energía absorbida (DI/ABS); por su parte, la eficiencia con la que un excitón mueve un electrón más allá de QA ( $\phi_{Eo}$ ) es la fracción de energía absorbida que se utiliza en el transporte (ET/ABS). También se puede calcular la probabilidad de que un excitón mueva un electrón más allá de QA ( $\Psi_0$ ), como la fracción de energía atrapada en los centros de reacción y que se utiliza para realizar transporte electrónico (ET/TR; Figura 4).

Para obtener los parámetros mencionados en el párrafo anterior a partir de las señales de fluorescencia de la curva polifásica, se puede consultar la Tabla 1, donde se indican las operaciones algebraicas para obtener cada parámetro de la prueba JIP.

#### *vi.2) La prueba de fluorimetría modulada*

La otra técnica con que se ha estudiado la fluorescencia de la clorofila *a*, está basada en la utilización de pulsos de luz modulada para obtener la señal de fluorescencia, además de pulsos de luz saturante bajo una condición de irradiación con luz actínica (Figura 5). En este escenario, la señal de fluorescencia en presencia de luz actínica refleja la integración de la actividad fotoquímica bajo una condición de luz actínica definida, y el pulso de luz saturante permite obtener la señal de fluorescencia durante el cierre momentáneo de los centros de reacción que participan en dicha actividad. Con estos datos se puede estudiar la fracción energética empleada en trabajo fotoquímico y aquella fracción disipada por mecanismos no fotoquímicos. En los primeros se encuentra la utilización eficiente de la energía de excitación en los fotosistemas dos para realizar la separación de carga, mientras que los segundos dependen de la ruta que siga la energía de excitación para la relajación de la clorofila *a* hacia su estado basal  $S_0$  (Figura 1), de los cuales la liberación en forma de calor es el principal (Pfündel *et al.*, 2013).

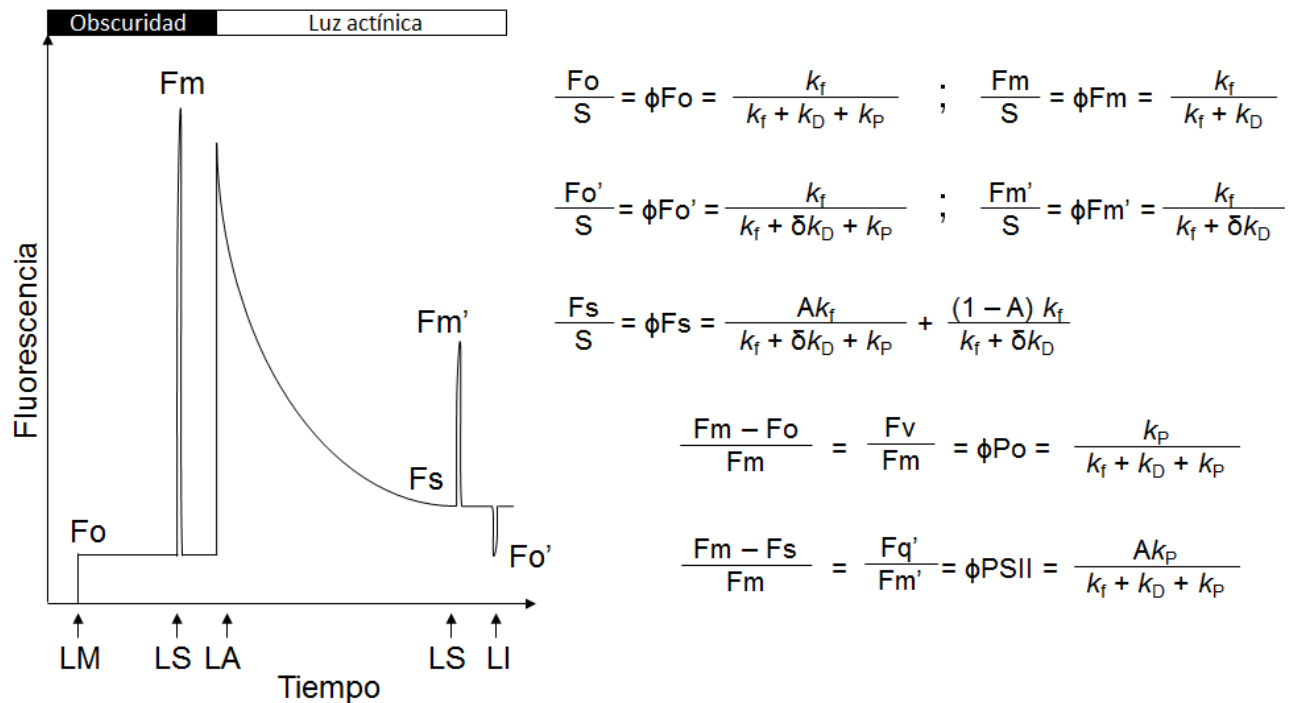


Figura 5. Protocolo para el análisis del decaimiento de la fluorescencia de la clorofila a mediante pulsos de luz modulada. La muestra fotosintética se mantiene en obscuridad y se comienza el registro al encender la luz modulada (LM) para obtener el valor de fluorescencia mínima ( $F_o$ ) y enseguida se aplica un pulso de luz saturante (LS) para obtener la fluorescencia máxima ( $F_m$ ). Posteriormente se irradia con luz actínica (LA) hasta obtener un valor estable de fluorescencia ( $F_s$ ), luego se aplica un nuevo pulso de luz saturante (LS) para obtener el valor de fluorescencia máxima a la luz ( $F_m'$ ), y enseguida se apaga la luz actínica para aplicar un pulso de luz infrarroja (LI) con el que se obtiene el valor de fluorescencia mínima a la luz ( $F_o'$ ). De acuerdo a la teoría de los rendimientos energéticos, utilizando un factor de sensibilidad relacionado a la respuesta del instrumento ( $S$ ), cada valor de fluorescencia medido tiene su correspondiente rendimiento energético ( $\phi$ ). Dado que la energía absorbida por la clorofila puede ser disipado mediante tres rutas (por fluorescencia ( $f$ ), térmica ( $D$ ) y fotoquímica ( $P$ )), el resultante rendimiento energético para cada valor de fluorescencia corresponde a la relación de la constante de disipación por fluorescencia ( $k_f$ ) entre la suma de las constantes de disipación que participan en cada evento ( $k_f, D, P$ ). En el caso de los parámetros medidos bajo luz actínica, la constante de disipación térmica contiene un factor de disipación ( $\delta$ ) asumiendo que sólo la disipación térmica varía durante el paso de una condición de obscuridad hacia una de luz actínica. Además, bajo las condiciones de luz actínica el rendimiento de fluorescencia estable



contiene un parámetro que indica la fracción de moléculasceptoras primarias que son oxidables bajo esa condición lumínica (A).

El análisis de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* consiste de modelos que consideran la estructura del fotosistema dos, con sus antenas, como unidades individuales o como unidades interconectadas, conocidos como modelo de “*puddle*” o “*lake*”, respectivamente. Ambos modelos difieren en la forma en cómo las antenas logran transferir la energía obtenida de la luz. Pese a lo anterior se ha demostrado que parámetros como el rendimiento cuántico máximo del PSII (Fv/Fm; Kitajima y Butler, 1975), o el rendimiento cuántico operacional del PSII en una condición lumínica dada (Fq'/Fm'; Kramer *et al.*, 2004), son concordantes con ambos modelos, tanto en el de las unidades independientes como en las interconectadas.

#### vii) Modelo biológico

Las leguminosas están consideradas dentro de un amplio intervalo de resistencia a la salinidad. En el caso del frijol mungo (*Vigna radiata*), Läuchli (1984) lo cataloga junto con la soya (*Glycine max*), el alfalfa (*Medicago sativa*), el ayocote (*Phaseolus coccineus*) y el trébol rojo (*Trifolium pratenses*) en un grado intermedio de resistencia.

*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek es una planta perteneciente a la familia Fabaceae, del orden Fabales, que produce una semilla pequeña de color verde conocida como frijol mungo. El producto más importante de los cultivos de *Vigna radiata* es su semilla dado su alto valor nutrimental (Directorate Plant Production, 2010). En el mundo ésta planta se cultiva en alrededor de seis millones de hectáreas; los principales productores de frijol mungo en el mundo, con una producción anual aproximada de tres millones de toneladas, son India, China y Birmania (Nair *et al.*, 2013).

Pese a lo anterior, aún no se han desarrollado cultivares o variedades de *Vigna radiata* que sean tolerantes a la salinidad, pues en las regiones áridas y semiáridas éste es un problema que restringe su producción (Sehrawat *et al.*, 2013).

Experimentos con tallos y raíces cortados de frijoles, han demostrado que una fracción importante de la tolerancia a la salinidad se debe a que mucho del Na<sup>+</sup> es retenido en estos órganos para evitar su llegada a los tejidos fotosintéticos (Jacoby, 1964; Jacoby, 1965). Misra *et al.* (1996), señalan que la estrategia que utilizan plántulas de frijol mungo frente a la salinidad desde la germinación, consiste de la acumulación de prolina para permitir el mantenimiento de la elongación de raíces. En 2007, Manivannan *et al.* demostraron que la adición de CaCl<sub>2</sub> al tratamiento con NaCl, redujo el impacto de la toxicidad por NaCl en plantas de *Vigna radiata*, observaron un

incremento en osmolitos compatibles y enzimas antioxidativas, así como una menor disminución en el crecimiento de tallos y raíces.

En un estudio de campo hecho con dos variedades de frijol mungo cultivado en Bangladesh (Hossain *et al.*, 2008), se observó que el incremento en la salinidad del suelo afectó de manera distinta el rendimiento de ambos cultivares, relacionándose una mayor sensibilidad con un incremento en la concentración de  $\text{Na}^+$  foliar, con la consecuente disminución del  $\text{K}^+$ .

La comprensión de los eventos fotoquímicos y respiratorios son de interés ya que son reflejo de los mecanismos de resistencia de las plantas frente a los distintos grados de presencia de un factor de estrés. El estudio de un modelo de ambiente en proceso de deterioro por causa de salinización en plantas de interés alimentario, requiere evaluar la actividad fotosintética y respiratoria como eventos primarios en el metabolismo vegetal que dejan entrever su importancia en la salud de la planta.

## **Objetivos**

### *Objetivo General*

Evaluar el efecto de la salinidad por NaCl en el metabolismo energético y distribución iónica de *Vigna radiata* crecida en condiciones de laboratorio.

### *Objetivos Particulares*

Caracterizar la respuesta de los procesos fotosintético y respiratorio en *Vigna radiata* ante el estrés salino.

Evaluar el contenido de osmolitos compatibles en tejidos de hoja, tallo y raíz de *Vigna radiata*.

Caracterizar el crecimiento de plántulas de *Vigna radiata* sometidas a un periodo de 7 días de salinidad.

Describir el efecto de la salinidad en el contenido de clorofila *a* y *b* y carotenoides totales de *Vigna radiata*.

Estudiar la distribución iónica de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y P en *Vigna radiata* bajo condiciones de estrés salino.

## **Materiales y métodos**

### **Protocolo experimental**

#### *Obtención de material vegetal*

Semillas de *Vigna radiata* se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% durante 10 minutos, luego se lavaron varias veces con agua corriente y se dejaron en imbibición durante 24 horas con agua destilada. Posteriormente, las semillas se colocaron en cuatro charolas de malla con apertura de 5 mm (una por cada grupo experimental) en una cámara de germinación iluminada con dos lámparas fluorescentes de luz blanca ( $30 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ;) e irrigada con goteo de agua corriente con fotoperiodo de 12 horas de luz. Dos días después, las charolas se colocaron en cajas de plástico conteniendo 2 litros de solución nutritiva Hoagland (la composición de la solución se puede consultar en el *Apéndice*; Hoagland y Arnon, 1950) con aireación para evitar el crecimiento de microorganismos, y se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ( $25\text{-}28^{\circ}\text{C}$ ) y densidad de flujo fotónico ( $30 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; 12 horas de luz). Dos días después las charolas se colocaron bajo una fuente fotónica mayor a las condiciones de germinación ( $300 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 12 horas de luz) y se mantuvieron por cinco días más en esta condición. Cada día se recuperó el agua evaporada agregando agua destilada.

#### *Tratamiento con NaCl.*

Diez días posteriores al inicio de la germinación, los grupos experimentales fueron tratados con NaCl a concentraciones de 0, 50 100 y 150 mM en solución Hoagland y recuperando cada día el agua evaporada con agua destilada. Tres a cuatro días después se realizó un recambio de la solución nutritiva con sus respectivas concentraciones de NaCl. Transcurridos siete días de mantener la condición salina se determinaron los siguientes parámetros.

### **Evaluación del crecimiento**

Se midió la longitud de tallo y de raíz con una regla graduada. El área foliar se midió por gravimetría mediante una copia fotostática en papel bond.

El peso seco de cada órgano vegetal (hoja, tallo y raíz) se obtuvo de un total de diez plantas, secando las muestras durante al menos 72 horas a  $70^{\circ}\text{C}$ .

## Medición de la concentración de clorofilas y carotenoides totales

La cuantificación de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides totales, se realizó a partir de 5 discos de hoja de 10 mm de diámetro. Los pigmentos se extrajeron utilizando acetona al 80% (v/v) y se midió la absorbancia (Abs) del extracto en tres longitudes de onda: 663, 646 y 470 nm. El cálculo de la concentración de los pigmentos se realizó según lo establecido por Wellburn en 1994. Las concentraciones de los pigmentos se obtuvieron como  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  en la solución de la celda del espectrofotómetro de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$[\text{Clorofila } a] = 12.21 \text{ Abs}_{663} - 2.86 \text{ Abs}_{646}$$

$$[\text{Clorofila } b] = 20.13 \text{ Abs}_{646} - 2.86 \text{ Abs}_{663}$$

$$[\text{Carotenoides totales}] = (1000 \text{ Abs}_{470} - 3.27 [\text{Clorofila } a] - 104 [\text{Clorofila } b]) / 198$$

## Ensayo de Fotosíntesis

### *Liberación de oxígeno*

La tasa de liberación de oxígeno se determinó en un oxímetro (Oxygraph Hansatech, England) con cámara de fase gaseosa, midiendo la tasa de liberación de oxígeno en 5 discos de hoja de 10 mm de diámetro, expuestos a una densidad de flujo fotónico de  $400 \mu\text{moles de fotones } \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , proporcionada por una lámpara de 36 fotodiodos emitiendo luz roja de 660 nm, en intervalos de dos minutos. Los registros se efectuaron a temperatura ambiente, después de adaptar los discos de hoja durante 2 minutos a la obscuridad. En la cámara de disco de hoja se agregó 1 ml de  $\text{NaHCO}_3$  1M como fuente de dióxido de carbono.

### *Medición del transporte electrónico en membranas tilacoidales aisladas*

Se obtuvieron 9.4 g de hojas frescas de plantas sometidas a experimentación durante siete días y se licuaron en licuadora de cocina con 75 ml de medio de homogenización ( $\text{MgCl}_2$  1 mM, Sorbitol 400 mM, NaCl 10 mM, Tricina 50 mM, pH 7.8) durante ocho segundos a máxima velocidad. El producto se filtró a través de ocho capas de gasa de algodón y se centrifugó durante 60 segundos a 5000 rpm en centrífuga clínica. La pastilla se suspendió en 35 ml de medio de resuspensión (tricina 50 mM, NaCl 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, pH 7.8) y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 5 ml de medio de homogenización (Hurry y Huner, 1992). Una fracción de 50  $\mu\text{l}$  de la muestra se aforó a 10 ml con acetona (80 %), y su absorbancia a 652 nm se multiplicó por 27.8 (coeficiente de extinción molar) para conocer la concentración de clorofila total ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Moore y Whitehouse, 1997).

La medición de la velocidad de transporte electrónico a través del fotosistema dos y uno se realizó a través de la medición del consumo de oxígeno (González *et al.*, 2008). En la celda del oxímetro se adicionó 725  $\mu\text{l}$  de medio de reacción (sorbitol 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, Hepes 50 mM, NaCl 5 mM,  $\text{NaN}_3$  5 mM (como inhibidor de la respiración mitocondrial residual); Hurry y Huner, 1992) y 200  $\mu\text{l}$  del extracto de tilacoides. Se utilizaron 20  $\mu\text{l}$  de metilviológeno (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo; 100  $\mu\text{M}$ ) como aceptor artificial de electrones del fotosistema uno. Éste compuesto se reduce entre los acarreadores  $F_x$  y  $F_A F_B$  del lado aceptor del fotosistema uno, para después consumir oxígeno.

Para observar la actividad del fotosistema uno se adicionó a la misma preparación 20  $\mu\text{l}$  de DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea; 1 mM) para inhibir el transporte electrónico entre los intermediarios QA y QB del lado aceptor del fotosistema dos. Inmediatamente se adicionaron 25  $\mu\text{l}$  de ascorbato (200 mM) y 10  $\mu\text{l}$  de DCPIP (2,6-diclorofenol indofenol; 10 mM) para la donación acoplada de electrones a nivel de plastocianina y la posterior reducción a través del fotosistema uno del metilviológeno.

#### *Medición de la emisión de Fluorescencia de la clorofila a*

Se utilizó un Analizador de la Eficiencia Fotosintética (Handy PEA Hansatech, England), con el que se registró la cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila *a* de hojas preacondicionadas a la obscuridad por 15 minutos. Se aplicó un pulso de luz roja (680 nm) con una densidad de flujo fotónico de 3500  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  mediante una fuente de 6 fotodiodos, y el registro de fluorescencia fue hecho con un fotodetector (Hansatech Ltd., King's Lynn, England) desde 10  $\mu\text{s}$  hasta 3s.

Se obtuvieron los datos de la cinética de inducción de fluorescencia de la clorofila *a* (Strasser *et al.* 2000) procesados con el programa Handy PEA. Posteriormente los datos se analizaron mediante la prueba JIP (Strasser y Strasser, 1995) con el programa Biolyzer 2.0, para obtener los parámetros enlistados en la Tabla 1.

Tabla 1. Definición de los parámetros utilizados en el análisis JIP de la cinética polifásica de la fluorescencia de la clorofila a (Strasser, 1981; Strasser y Strasser, 1995; Strasser *et al.*, 2004).

Término	Fórmula	Definición
F <sub>o</sub>	= F <sub>50μs</sub>	Señal de fluorescencia cuando todos los centros de reacción se encuentran abiertos
F <sub>p</sub>	= F <sub>m</sub>	Señal de fluorescencia máxima, se registra cuando todos los componentes del transporte de electrones están reducidos
F <sub>k</sub>	= F <sub>300μs</sub>	Fluorescencia registrada cuando los electrones fluyen desde el lado donador hacia el centro de reacción del PSII
F <sub>j</sub>	= F <sub>2ms</sub>	Fluorescencia registrada cuando el pool de QA se reduce completa pero momentáneamente a los 2 milisegundos
F <sub>v</sub>	= F <sub>m</sub> -F <sub>o</sub>	Fluorescencia variable
V <sub>j</sub>	= (F <sub>j</sub> -F <sub>o</sub> )/(F <sub>m</sub> -F <sub>o</sub> )	Fluorescencia variable relativa a 2 ms
M <sub>o</sub>	= (TR <sub>o</sub> /RC) - (E <sub>T</sub> <sub>o</sub> /RC) = V <sub>j</sub> (TR <sub>o</sub> /RC) = 4(F <sub>k</sub> -F <sub>o</sub> )/(F <sub>m</sub> -F <sub>o</sub> )	Velocidad inicial del cierre de los centros de reacción
TR <sub>o</sub> /RC	= M <sub>o</sub> DCMU = M <sub>o</sub> /V <sub>j</sub> = 4(F <sub>k</sub> -F <sub>o</sub> ) / (F <sub>j</sub> -F <sub>o</sub> )	Flujo de energía atrapada por centro de reacción
E <sub>T</sub> <sub>o</sub> /RC	= (TR <sub>o</sub> /RC)(1-V <sub>j</sub> ) = (M <sub>o</sub> /V <sub>j</sub> )(Ψ <sub>o</sub> )	Flujo de transporte de energía por centro de reacción
Ψ <sub>E<sub>o</sub></sub>	= (E <sub>T</sub> <sub>o</sub> /RC)/(TR <sub>o</sub> /RC) = 1-V <sub>j</sub>	Eficiencia con la que un excitón atrapado mueve un electrón después de la quinona A
φ <sub>P<sub>o</sub></sub>	= TR <sub>o</sub> /ABS = F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	Rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria
φ <sub>E<sub>o</sub></sub>	= (φ <sub>P<sub>o</sub></sub> )(Ψ <sub>o</sub> ) = (F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub> )(1-V <sub>j</sub> )	Probabilidad de que un excitón mueva un electrón después de la QA

Tabla 1 *continuación.*

Término	Fórmula	Definición
ABS/RC	$= (TRo/RC) / (TRo/ABS)$ $= (Mo/Vj) / (Fv/Fm)$	Flujo de energía absorbida por centro de reacción
DIo/RC	$= (ABS/RC) - (TRo/RC)$ $= ((Mo/Vj)/(Fv/Fm)) - (Mo/Vj)$	Flujo de energía disipada por centro de reacción, es decir la energía absorbida que no fue atrapada por los centros de reacción.
RC/ABS	$= 1/(ABS/RC)$	Número de centros de reacción en los que se absorbe el flujo de energía
ABS/CS <sub>Chl</sub>	$= Chl/CS$	Cantidad de clorofila por sección cruzada
RC/CS	$= (ABS/CS_{Chl}) / (ABS/RC)$	Densidad de centros de reacción por sección transversal
TRo/CS	$= (TRo/RC) (RC/CS)$	Captura de excitones por sección transversal
ETo/CS	$= (ETo/RC) (RC/CS)$	Transporte de electrones por sección transversal
$\Phi_{Do}$	$= (DIo/RC)/(ABS/RC) = 1 - (Fv/Fm)$ $= [((Mo/Vj)/(Fv/Fm)) - (Mo/Vj)] / (Mo/Vj)$	Probabilidad de disipación energética en forma de calor
PI <sub>ABS</sub>	$= (\gamma RC/1 - \gamma RC) \cdot [\Phi_{Po}/(1 - \Phi_{Po})] \cdot [\Psi_o/(1 - \Psi_o)]$	Índice de funcionamiento
PI <sub>TOTAL</sub>	$= (\gamma RC/1 - \gamma RC) \cdot [\Phi_{Po}/(1 - \Phi_{Po})] \cdot [\Psi_o/(1 - \Psi_o)] \cdot [\delta Ro/(1 - \delta Ro)]$ $= (RC/ABS) (TRo/ABS - TRo) (ETo/TRo - ETo) (REo/ETo - REo)$	Índice de funcionamiento para el transporte electrónico hacia los aceptores finales del fotosistema uno
DF <sub>ABS</sub>	$= \log (PI_{ABS})$ $= \log (RC/ABS) + \log [\Phi_{Po}/(1 - \Phi_{Po})] + \log [\Psi_o/(1 - \Psi_o)]$	Fuerza de conducción de la fotosíntesis

### *Medición de fluorescencia modulada*

Se utilizó un Sistema de Fluorescencia Modulada (FMS; Hansatech Ltd., King's Lynn, England) en muestras preacondicionadas durante 15 minutos a la obscuridad. El registro comenzó con la inducción de fluorescencia utilizando pulsos de luz modulada ( $0.1 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) para obtener el valor de fluorescencia mínima ( $F_o$ ); luego se aplicó un pulso de luz saturante ( $3000 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) para obtener el valor de fluorescencia máxima ( $F_m$ ) y a continuación se encendió la luz actínica ( $260 \mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Transcurridos 240 segundos se registró el valor de fluorescencia como  $F_s$ , y se aplicó un nuevo pulso de luz saturante para obtener el valor de fluorescencia máxima a la luz ( $F_m'$ ), enseguida se apagó la luz actínica y se aplicó luz infraroja, para registrar el valor de fluorescencia mínima bajo una condición lumínica ( $F_o'$ ).

Luego de obtener las mediciones anteriores se calcularon los parámetros  $qP$  ( $=F_m' - F_s / F_m' - F_o'$ , actividad fotoquímica que se relaciona con la disminución de la fluorescencia debido a la reducción de  $Q_A$ ),  $NPQ$  ( $=F_m - F_m' / F_m'$ , actividad no fotoquímica que refleja la disminución de la fluorescencia por la disipación de energía en forma térmica),  $\Phi_{PSII}$  ( $=F_q' / F_m' = F_m' - F_s / F_m'$ , rendimiento cuántico operacional del PSII; Genty *et al.*, 1989; Bolhar-Nordenkamp y Öquist, 1993) y  $rETR$  ( $=\Phi_{PSII} * PAR$ , tasa de transporte electrónico relativo; Baker, 2008).

## **Ensayo de Respiración**

### *Medición de consumo de oxígeno en hojas*

Se determinó a partir de los periodos de obscuridad de dos minutos durante el experimento de medición de liberación fotosintética de oxígeno en la cámara de disco de hoja.

### *Obtención de mitocondrias de raíz*

Se realizó de acuerdo al protocolo descrito en González y Peñalosa (2000) utilizando 30 g de peso fresco de raíz de cada grupo experimental. Las raíces se homogenizaron con 75 ml de medio de homogenización (Manitol 0.3 M, EGTA 1 mM, Cisteína 4 mM, PVP insoluble 0.1%, BSA 0.1 %, pH 7.4) a 4 °C en licuadora durante 12 segundos. En seguida se filtró a través de ocho capas de gasa y se ajustó el pH a 7.6 con trizma base. El extracto se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante se centrifugó de nuevo a 10000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. La pastilla se resuspendió en 1 ml de medio de lavado (Manitol 0.3 M, EGTA 0.05 mM, BSA 0.1 %, pH 7.4), se centrifugó a 8000 rpm con 30 ml más de medio de lavado durante 10 minutos a 4 °C y finalmente la pastilla se resuspendió de nuevo en un mililitro de medio de lavado.



La medición del consumo de oxígeno se realizó en una cámara con un electrodo tipo Clark a temperatura ambiente. El registro comenzó con la adición de 790  $\mu\text{l}$  de medio de reacción (Manitol 0.3 M, KCl 10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{MgCl}_2$  2.5 mM, pH 7.2) y 100  $\mu\text{l}$  del extracto de mitocondrias. Se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de succinato (100 mM) y posteriormente 10  $\mu\text{l}$  de ADP (20 mM). Se cuantificó la cantidad de proteínas presentes en el extracto de mitocondrias por el método de Bradford utilizando albúmina de suero bovino como patrón.

### **Cuantificación de iones**

Se colectaron muestras de raíz, tallo y hoja de plantas salinizadas durante siete días. Las muestras se lavaron con agua destilada y se secaron durante 48 horas a 70°C para triturar hasta polvo fino. Se pesó 0.2 g de material seco y se digirió con 4 ml de una mezcla de ácidos (ácido nítrico: ácido perclórico, 2:1) y 2 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %), se calentaron las muestras hasta volverse transparente la mezcla. Las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  se determinaron con un fotómetro de flama, CORNING 400, utilizando soluciones de 0 a 1 mM de NaCl y KCl como patrón. Las determinaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y P se realizaron mediante un espectrofotómetro de emisión atómica de plasma por inducción acoplada (ICP–AES Varian).

### **Cuantificación de osmolitos compatibles**

Se cuantificó la concentración de Prolina en muestras de raíz, tallo y hoja, de acuerdo al protocolo desarrollado por Bates *et al.*, en 1973. Se homogeneizaron 0.5 g de tejido fresco de raíz, tallo y hoja en mortero con 10 ml de solución de ácido sulfosalicílico (3 %) y se centrifugó durante cinco minutos a 3000 rpm. Se mezclaron 2 ml del sobrenadante con 2 ml de solución de ninhidrina ácida (1.25 g de ninhidrina, 30 ml de ácido acético y 20 ml de ácido fosfórico 6 M). La mezcla se calentó a ebullición durante una hora, y luego de enfriar en baño de hielos se adicionaron 4 ml de tolueno para mezclar en vortex. Se separó la fase de tolueno y se tomó su lectura de absorbancia a 520 nm utilizando L-prolina como patrón de 0 a 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Se realizó la cuantificación de azúcares reductores totales utilizando el reactivo de antrona por el método descrito en González *et al.*, 2006. Se maceraron 0.5 g de tejido fresco de raíz y hoja por separado, con 5 ml de etanol (95 % v/v), y el residuo insoluble se volvió a macerar con 5 ml adicionales de etanol (70 % v/v). La fase etanólica total se centrifugó 10 minutos a 3500 rpm. Una fracción de 0.1 ml de éste extracto se mezcló con 3 ml de reactivo de antrona (150 mg antrona, 100 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 72 %) y se mantuvo en baño de agua a ebullición por 10 minutos. Enfriadas las muestras se midió su absorbancia a 625 nm, utilizando glucosa como patrón de 0 a 100  $\mu\text{g}$ .

**Tratamiento estadístico**

Los resultados se expresaron como el promedio de las mediciones llevadas a cabo. Se aplicó un análisis de varianza de un factor (prueba de ANOVA) así como una prueba de Tukey.

## Resultados y análisis

El tratamiento salino comenzó diez días después del inicio de la germinación de semillas de *Vigna radiata*, momento en el que las plántulas presentaban ya el primer par de hojas cotiledonares. Transcurridos siete días, una fracción importante de las plantas tratadas con 50 mM de NaCl presentaron un aspecto similar al control, mientras que las tratadas con 100 y 150 mM de NaCl mostraron un retraso en la aparición de hojas nuevas trifoliadas y en el tamaño. El efecto visible del tratamiento durante siete días con las diferentes concentraciones de NaCl probadas, sobre plántulas de *Vigna radiata*, se puede apreciar en la fotografía de la Figura 6.



Figura 6. Efecto del NaCl sobre el tamaño de plántulas de *Vigna radiata* luego de siete días de exposición. Se muestra una planta tomada al azar de cada tratamiento y se indica la concentración de NaCl con que fue tratada durante siete días. La fotografía no representa con fidelidad las medidas de las raíces debido a que se perdió un poco de tejido durante su extracción, para mayor detalle de este parámetro ver la Tabla 2.

Es importante mencionar que la adición de NaCl en un solo paso ocasionó un shock osmótico en el momento de salinización de las plántulas (Shavrukov, 2013), a esto le siguió un cambio de turgencia y flacidez durante un par de horas. La recuperación a dicho cambio osmótico no fue medida, y dado que algunas plántulas murieron en ese lapso, el trabajo se realizó con aquellas que permanecieron vivas.

Se sabe que el efecto osmótico está asociado al comienzo de la salinidad en el medio, y al mismo tiempo que se presenta, comienza a desarrollarse el efecto tóxico que los iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  ejercen sobre el metabolismo. De este efecto osmótico, las plantas regularmente se recuperan algunas horas o hasta un día después, mientras se encuentren en el umbral de tolerancia, por lo que a éste se le considera como el factor principal para la disminución inicial de la población una vez iniciado el tratamiento (Munns, 2002).

### **Efecto del NaCl sobre el Crecimiento**

#### *Elongación de órganos vegetales*

El crecimiento de una planta se establece por la división y la expansión celular, que en conjunto con la diferenciación comprenden el desarrollo vegetal (Segura, 2008). Como resultado de la exposición a diferentes concentraciones de NaCl, la elongación de los órganos vegetales se modificó a una razón no muy clara, aunque sí evidente de forma sistemática para el desarrollo de las plantas expuestas (Figura 6 y Tabla 2).

La medición final de la longitud de raíces y tallos en las plantas salinizadas se modificó respecto al control de manera significativa (Tabla 2). Transcurridos siete días de tratamiento los grupos con concentraciones de 100 y 150 mM de NaCl resultaron en una longitud menor de raíz que la desarrollada por el control. En las plantas sin salinizar, la longitud del tallo incrementó de forma progresiva durante los días de medición, mientras en aquellas tratadas con 100 y 150 mM de NaCl hubo una atenuación hacia los siete días de salinización. En estos dos órganos el tratamiento con la menor cantidad de NaCl utilizada no mostró diferencias estadísticas con respecto al control (Tabla 2).

La concentración más baja de NaCl utilizada (50 mM) condujo a una elongación de tallos y raíces del 85 al 90 % de la longitud obtenida en las plantas control. Mientras que cuando las plantas se sometieron a un tratamiento de 100 mM de NaCl, la longitud de tallos representó una fracción del 85 % de lo alcanzado en el control, pero aproximadamente el 70 % en raíces. A su vez bajo el tratamiento de la mayor concentración de NaCl (150 mM) la longitud de tallos y raíces representó el 70 % de lo obtenido en el control.

La expansión del área foliar se redujo en mayor medida cuando la concentración de NaCl en el medio fue más elevada, de manera que al final del tratamiento el área foliar medida en las plantas bajo la concentración de 150 mM de NaCl, representó apenas el 50 % de lo obtenido en el control (Tabla 2).

La medición del área foliar se realizó a partir de las hojas cotiledonares además de las nuevas trifoliadas, pues éstas ya se encontraban presentes en el grupo control y el tratamiento con 50 mM de NaCl. En los demás tratamientos no se observó la aparición de hojas nuevas totalmente expandidas, así que los brotes no se consideraron para el estudio. De esta manera se puede decir que el potencial de expansión de área foliar para la utilización de la luz se redujo considerablemente como consecuencia de la presencia de NaCl mayor a 50 mM en el medio hidropónico.

Tabla 2. Efecto del NaCl sobre la longitud de raíz, tallo y hoja de plántulas de *Vigna radiata* en diferentes días de tratamiento. El área foliar representa la suma del área de las dos hojas cotiledonares de cada planta y de las hojas nuevas trifoliadas expandidas en caso de estar presente. Los números pequeños indican la desviación estándar y las letras diferentes las diferencias entre las medias para cada tratamiento de acuerdo a la prueba de Tukey ( $n=5$ ,  $p<0.05$ ), nd: no hay diferencias estadísticas.

		0 días	3 días	5 días	7 días
Raíz (cm)	0 mM	19.46 2.10 nd	21.34 2.53 nd	22.9 5.05 nd	25.8 1.08 a
	50 mM	18.38 1.10 nd	21.44 2.27 nd	22.1 2.85 nd	23.36 2.30 a
	100 mM	15.98 1.54 nd	17.28 1.61 nd	18.12 1.55 nd	17.1 2.38 b
	150 mM	15.76 3.53 nd	18.46 2.96 nd	17.68 3.08 nd	17.86 2.03 b
Tallo (cm)	0 mM	12.9 1.16 nd	16.8 1.91 a	18.64 1.92 a	19.06 2.32 a
	50 mM	11.12 0.92 nd	12.44 1.13 b	16.22 2.19 ab	16.56 1.19 a
	100 mM	12.28 0.57 nd	14.12 1.02 b	15.22 2.41 ab	16.76 0.85 ab
	150 mM	12.3 1.15 nd	14.24 1.52 ab	13.6 1.52 b	13.48 2.27 b
Hoja (cm <sup>2</sup> )	0 mM	14.26 1.53 a	19.41 2.97 a	22.36 1.23 a	23.3 2.62 a
	50 mM	10.02 2.20 ab	16.34 2.85 ab	16.31 1.35 b	19.57 2.03 a
	100 mM	9.92 1.61 b	14.01 1.96 b	11.68 1.89 c	13.76 2.14 b
	150 mM	11.03 2.70 b	12.93 2.49 b	12.71 1.04 c	11.05 1.57 b

Es evidente el efecto de la salinidad sobre la elongación a pesar de las variaciones en las mediciones obtenidas. A lo largo del tratamiento se puede apreciar que las raíces se mantiene durante la mayor parte del tratamiento (hasta cinco días) sin diferencias marcadas en el retraso de la elongación hasta llegado el séptimo día. Mientras que en tallos las diferencias se aprecian más

tempranamente, es decir, el retraso en su elongación se observa con más evidencia al inicio del tratamiento (Tabla 2).

Los datos obtenidos de la Tabla 2 fueron vertidos en un diagrama de cajas que se muestra en la Figura 7 con el fin de ilustrar la distribución de las mediciones de elongación. Éste diagrama está compuesto por una caja central que representa el intervalo donde se encuentra el 50 % de la población de datos medidos, una línea que atraviesa dicha caja, que representa el valor de la mediana y dos líneas verticales (superior e inferior) que se prolongan para indicar las mediciones extremas.

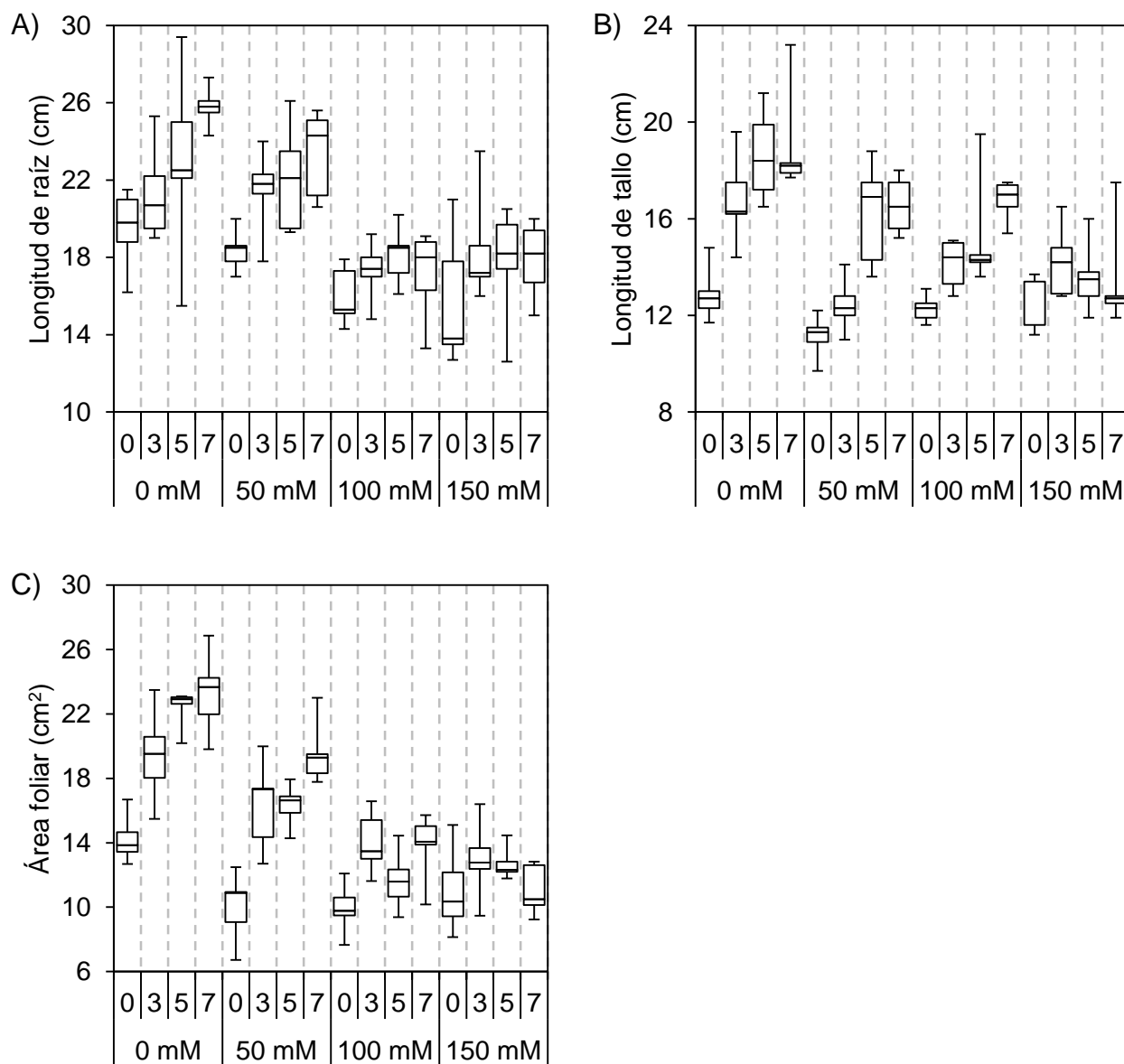


Figura 7. Efecto de la salinidad sobre la longitud de raíz (A) y tallo (B) y área foliar (C). El diagrama de cajas se construyó con los mismos datos de la Tabla 2. Se indica

en el eje de las abscisas para cada tratamiento de NaCl (mM) los días de medición a partir del comienzo de la salinización (0, 3, 5 y 7 días).

Las plantas que se colectaron para las mediciones de las estructuras vegetales (longitudes y biomasa), dejaron de participar en el experimento una vez realizada la medición, además que, como efecto del tratamiento durante dicho tiempo continuaron muriendo algunas plantas de las que no se evaluó su tamaño. Se sabe que el crecimiento se afecta como resultado de la entrada excesiva de iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a las células que no controlan su crecimiento (Zhu, 2001). Probablemente la fracción de plantas que continuaron su crecimiento en presencia de NaCl (Tabla 2) resultaron en una toxicidad elevada lo que condujo a su muerte, y el resultado final observado se deba más bien a una diversidad genética presente en esta variedad de frijol mungo (medición a los siete días, Tabla 2), resultando en la sobrevivencia de plantas que detuvieron su crecimiento frente al NaCl durante el tratamiento.

#### *Evaluación del Peso seco*

El efecto del NaCl sobre el peso seco en los órganos de *Vigna radiata* se aprecia como columnas apiladas de la Figura 8. Luego de siete días de tratamiento con NaCl se observa que el peso seco por planta disminuyó de manera significativa en aquellas tratadas con 100 y 150 mM de NaCl. Mientras la biomasa presente en la parte aérea disminuye de una forma casi constante con el aumento de la salinidad, la de raíz sólo se modificó respecto del control en el tratamiento de 150 mM de NaCl. De nuevo, las mediciones de peso seco en hojas consideraron las hojas cotiledonares y las nuevas trifoliadas en caso de estar presentes.

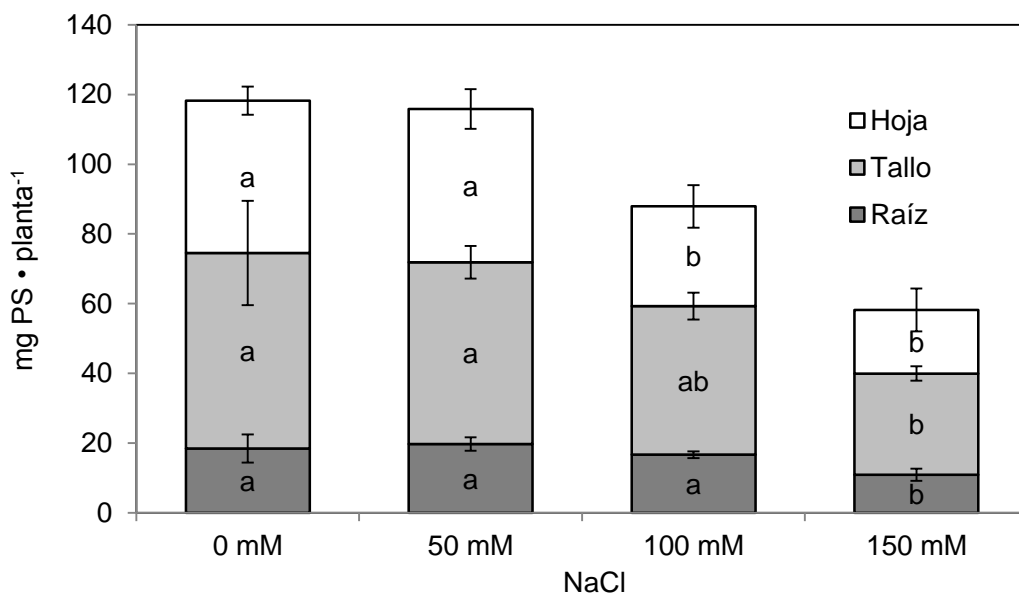


Figura 8. Efecto del tratamiento de NaCl sobre la biomasa medida como peso seco (PS) de los órganos vegetales Raíz, Tallo y Hoja de *Vigna radiata* después de 7 días de salinización. Las letras diferentes indican diferencias significativas para cada órgano ( $p < 0.05$ ),  $n=3$ ,  $\pm$  desviación estándar.

La inhibición en la acumulación de biomasa no parece estar presente en concentraciones de 50 mM de NaCl, mientras que en concentraciones de 100 mM hubo una inhibición promedio del 9, 24 y 34 %, para la raíz, tallo y hoja, respectivamente. En presencia de 150 mM de NaCl la inhibición alcanzó el 40, 48 y 58 % para las mismas estructuras.

Al obtener la relación del peso respecto a la longitud del tallo y raíz o del área foliar, el análisis estadístico no muestra diferencias, aunque se aprecia una tendencia en la disminución de este valor (Figura 9). Este resultado probablemente esté relacionado a un cambio de turgencia que acompaña las diferencias en biomasa y no muestra cambios en la densidad de biomasa por unidad de longitud. A partir de los datos anteriores, la relación de biomasa vástago/raíz muestra una tendencia a disminuir (inserto de la Figura 9).

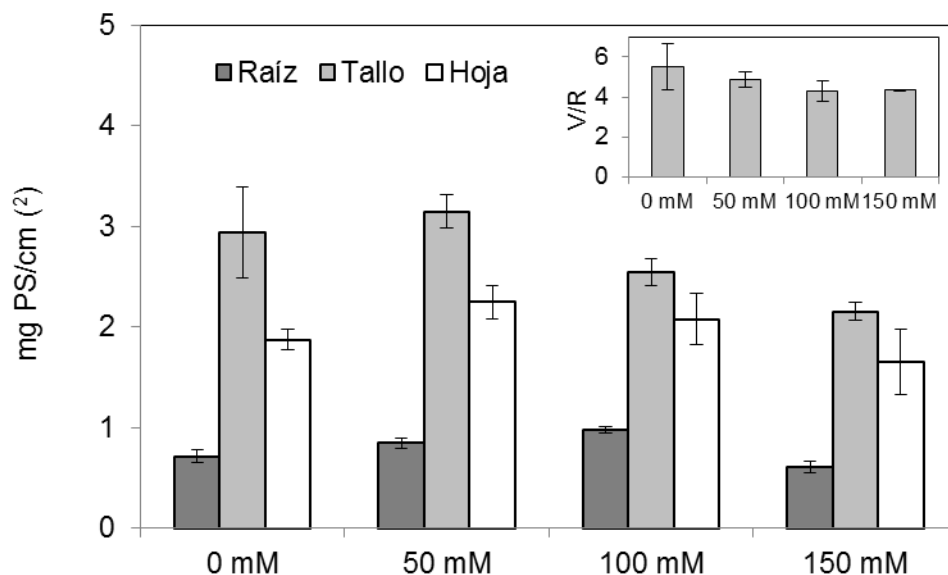


Figura 9. Efecto de la salinidad sobre la relación del peso seco y la longitud de Raíz y Tallo (mg PS/cm) y el área de Hoja (mg PS/cm<sup>2</sup>). En el inserto se muestra la relación de biomasa vástago/raíz (V/R). Estadísticamente no se observaron diferencias entre éstos parámetros obtenidos,  $n=3$ ,  $\pm$  desviación estándar.

Con los datos de la Tabla 2 se obtuvo la proporción de incremento de elongación durante siete días de salinización, expresada como la tasa de crecimiento relativo (TCR):



$$TCR = \mu = \frac{\ln L_f - \ln L_i}{T_f - T_i} \quad (\text{Barrera et al., 2010})$$

Donde  $\ln$  es el logaritmo natural,  $L_f$  – longitud final,  $L_i$  – longitud inicial,  $T_f$  – tiempo final y  $T_i$  – tiempo inicial.

Este parámetro (Figura 10), permite observar el efecto de la salinidad sobre la ralentización en el crecimiento de raíz y tallo en las plántulas y su relación con la concentración de NaCl en el medio hidropónico. En hojas, la concentración de 50 mM de NaCl, ocasionó un incremento en la expansión del área foliar, pero fue abatido con condiciones de NaCl más alta, particularmente después de la concentración de 100 mM de NaCl.

La Tasa de Asimilación Neta (TAN; inserto de la Figura 10), obtenida a partir de los datos anteriores y de la Figura 8, muestra que el incremento en masa de las plantas sometidas a salinidad mantiene una relación inversa a la concentración de sal en el medio, según la ecuación:

$$TAN = \frac{\frac{P_f - P_i}{T_f - T_i}}{\frac{\ln AF_f - \ln AF_i}{AF_f - AF_i}} \quad (\text{Barrera et al., 2010}).$$

Donde  $P_f$  – peso de la medición final y  $P_i$  – peso inicial,  $T_f$  – tiempo de medición final y  $T_i$  – tiempo inicial,  $\ln$  es el logaritmo natural de  $AF_f$  – área foliar para la medición final y  $AF_i$  – área foliar inicial.

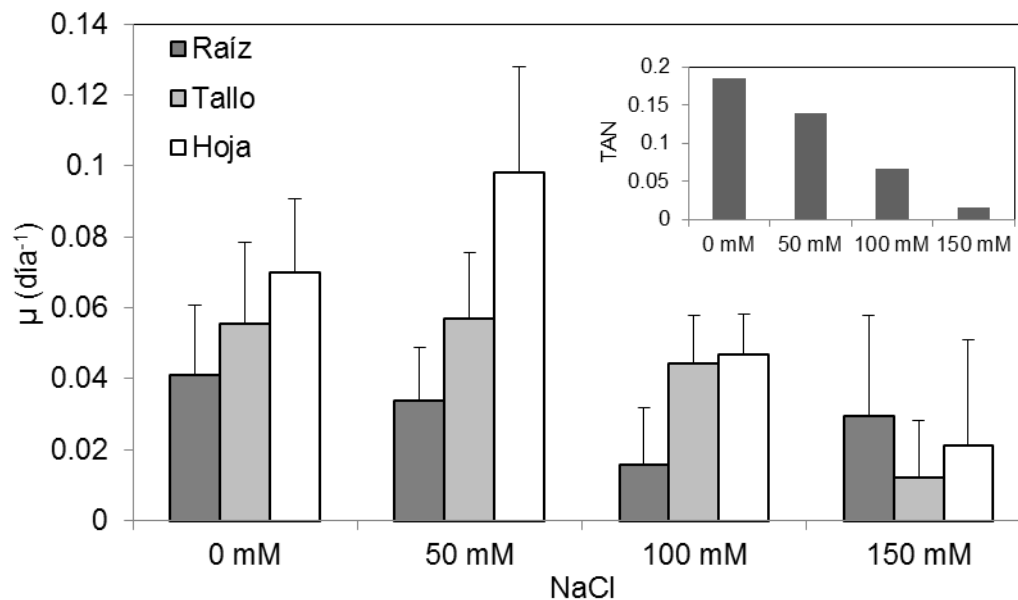


Figura 10. Efecto de la salinidad sobre la Tasa de Crecimiento Relativo ( $\mu$ ) entre el inicio de la salinidad y transcurridos siete días. En el inserto se muestra la Tasa de Asimilación Neta (TAN;  $\text{g}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{día}^{-1}$ ) obtenida a partir de los promedios de la Tabla 2 y

Figura 8 en relación a la concentración de NaCl de tratamiento.  $n=3$ ,  $\pm$  desviación estándar.

La gráfica anterior muestra una relación de crecimiento proporcional en los tres órganos vegetales. Para el grupo control y de 50 mM de NaCl, la elongación de la hoja es mayor que la del tallo y éste mayor, a su vez, que el de la raíz en las plantas control ( $\mu_{\text{hoja}} > \mu_{\text{tallo}} > \mu_{\text{raíz}}$ ). Dicha proporción de crecimiento se modifica con concentraciones de NaCl mayores. En las plantas tratadas con 100 mM de NaCl, la tasa de crecimiento de las hojas es menor y mantiene un nivel equivalente al del tallo, mientras que en aquellas tratadas con 150 mM de NaCl, el crecimiento de hojas y tallo es abatido en mayor medida y el de la raíz se mantiene equiparable al de los demás tratamientos.

Según los datos anteriores existe una afectación en el crecimiento sobre plantas de *Vigna radiata* en concentraciones de NaCl de 100 y 150 mM de NaCl probadas en un medio hidropónico. Aunque no se evaluó a detalle, bajo el presente modelo experimental de salinidad, el desarrollo vegetal parece modificarse por una ralentización en la división celular, teniendo como consecuencia el retraso ontogénico. Una evidencia que apoya esta observación, pero que requiere un estudio a detalle, es que con el tratamiento salino, la parte aérea de la planta mostró un retraso en la aparición de hojas nuevas trifoliadas, mismo que podría relacionarse con una disminución en la tasas de asimilación neta (inserto Figura 10).

Se ha demostrado que plantas de frijol mungo crecidas durante cinco días en salinidad muestran una disminución del 29 y 62 % de crecimiento de tallos, en condiciones de 6 y 12 EC (unidades de conductividad eléctrica; aproximadamente 60 y 120 mM de NaCl respectivamente); según los autores la reducción en biomasa como peso fresco y seco puede ser debida a la inhibición de procesos como la división, elongación y diferenciación celular (Singh *et al.*, 2003).

Diversos factores ambientales pueden afectar el crecimiento y la productividad de las plantas (Marshall, 1988). Según Yeo (1983) las afectaciones al crecimiento y balance general de energía en situaciones en que no se presenta toxicidad intracelular por la presencia de  $\text{Na}^+$  o  $\text{Cl}^-$ , son debidas a factores como 1) el ajuste osmótico mediante solutos compatibles, el cual compite con el crecimiento por las fuentes de carbono, 2) la fotosíntesis disminuida, debido a un incremento en la resistencia estomática, 3) los procesos de transporte activo de iones y de mantenimiento (debidos al daño) que compiten por carbohidratos, 4) el transporte de iones que puede competir con otros procesos por energía, especialmente provenientes de la respiración en la oscuridad, y 5) la capacidad del transporte de iones que podría ser inadecuada.

Se ha determinado también que la salinidad tiene un efecto significativo en diferentes estados de crecimiento de las plantas. En *Vigna unguiculata* el estado de crecimiento vegetativo es más

sensible que el estado de floración y de llenado de vaina (Maas y Poss, 1989). Mientras que en *Vigna radiata* la salinidad impacta de igual forma el desarrollo en estado germinativo y de plántula (Ashraf y Rasul, 1988).

Aún no es claro si en la inhibición temprana del crecimiento la acumulación excesiva de  $\text{Na}^+$  es el principal efector para el retraso en el crecimiento. Es decir que la reducción del crecimiento en salinidad sea debido a la disminución de la plasticidad de la pared celular o por el propio efecto osmótico del ambiente circundante a las células (Neumann, 1997).

En contraparte, plantas de *Vicia faba* (con un grado moderado de tolerancia a salinidad) sometidas a concentraciones de cloruro de sodio (100 mM) mostraron un incremento en la altura de las plantas (Abdul, 2011). Probablemente este efecto sea debido a que la baja cantidad de sal para esta planta puede ser utilizada como componente osmótico para la elongación celular, aunque existe una disminución en el área foliar, el peso seco de la planta tuvo una tendencia a incrementar; es decir se encontró un efecto positivo del cloruro de sodio en estos parámetros. Sin embargo, concentraciones mayores de NaCl mostraron efectos negativos. Este planteamiento puede dar una explicación acertada acerca de la capacidad de manejo del impacto que se presenta con niveles de salinidad bajos sobre el crecimiento vegetal. Esto es, concentraciones mínimas de NaCl ejercen un efecto positivo y probablemente sinérgico en el crecimiento, ya que el  $\text{Na}^+$  podría ser utilizado como componente osmótico vacuolar durante la división celular. Aunque la localización subcelular de los iones no fue evaluada, esto explicaría los resultados observados en el tratamiento con 50 mM de NaCl (Tabla 2).

### **Efecto del NaCl sobre el contenido iónico**

La distribución de iones inorgánicos (nutrimentos) en una planta puede ser explicada por la ruta de transporte que toma dicho elemento a través de la planta y mediante las propiedades de almacenaje de las células que se encuentran en contacto con dicho elemento, durante su transporte (Conn y Gilliam, 2010).

En situaciones de estrés, el desequilibrio iónico en el medio y en la planta resultan frecuentemente en desordenes nutrimentales que pueden ser debidos a la disponibilidad de cada uno de ellos, a la competencia en el consumo, transporte o distribución dentro de la planta o a la inactivación fisiológica para la utilización de un nutriente dado (Grattan y Grieve, 1999).

#### Relaciones iónicas en raíz

El contenido total de iones en raíces de *Vigna radiata* se evaluó al final del tratamiento de siete días de salinidad (Tabla 3). La concentración de  $\text{Na}^+$  presente en este órgano incrementó a partir

del tratamiento con la concentración más baja de NaCl (50 mM), mientras que la concentración más elevada (150 mM) presentó una concentración de casi dos órdenes de magnitud mayor que el control. Además, el Magnesio ( $Mg^{2+}$ ) y el Fósforo (P) también incrementaron su concentración en las muestras digeridas de este mismo órgano. El  $Mg^{2+}$  incrementó casi en un 20 % en condiciones de 50 mM de NaCl, 44 % con la concentración de 100 mM de NaCl y se mantuvo en 48 % en 150 mM de NaCl. Por otra parte, la concentración de P se elevó en 40 % en el tratamiento con 50 mM de NaCl, comparada con el control, y llegó a un 70 % en los demás tratamientos.

Por el contrario, los iones de Potasio ( $K^+$ ) tuvieron un decremento de su presencia en la masa seca de éste órgano como efecto del incremento de NaCl en la solución Hoagland. En presencia de 50 mM de NaCl, el  $K^+$  representó el 46 % de la condición control, mientras que en condiciones de 100 y 150 mM de NaCl sólo se obtuvo el 34 y 30 %, respectivamente. Los iones de  $Ca^{2+}$  también mostraron una tendencia a disminuir en concentración, aunque no presentaron diferencias estadísticas significativas.

Tabla 3. Contenido iónico en raíces de *Vigna radiata* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ,  $\pm$  desviación estándar, nd: no hay diferencias estadísticas.

NaCl	$Na^+$ $\mu$ mol/g PS	$K^+$ $\mu$ mol/g PS	$Mg^{2+}$ mmol/g PS	$Ca^{2+}$ mmol/g PS	P mmol/g PS
0 mM	28.5 $\pm$ 13.4 c	2114.6 $\pm$ 142.3 a	0.146 $\pm$ 0.032 b	0.108 $\pm$ 0.001 nd	0.422 $\pm$ 0.018 b
50 mM	1718.5 $\pm$ 123.1 b	981.9 $\pm$ 67.9 b	0.173 $\pm$ 0.016 ab	0.098 $\pm$ 0.005 nd	0.594 $\pm$ 0.064 ab
100 mM	2259.9 $\pm$ 85.4 a	736.9 $\pm$ 91.8 b	0.211 $\pm$ 0.014 a	0.093 $\pm$ 0.009 nd	0.740 $\pm$ 0.118 a
150 mM	2205.4 $\pm$ 117.2 a	651.8 $\pm$ 181.1 b	0.217 $\pm$ 0.004 a	0.089 $\pm$ 0.013 nd	0.734 $\pm$ 0.103 a

#### Relaciones iónicas en tallo

El contenido iónico de las muestras de tallos mostró un patrón diferente al de la raíz para los diferentes iones medidos (Tabla 4). La concentración alcanzada en los tratamientos supero la del control más de 60 veces la concentración en 50 mM de NaCl, 113 en 100 mM y 138 en 150 mM respectivamente. El P resultó en una cantidad incrementada en las muestras que recibieron tratamiento de NaCl, hasta casi el 20 % por encima del grupo control. De la misma forma que en la raíz, en tallo los iones de  $K^+$  disminuyeron su cantidad por biomasa seca en presencia de 50 mM de NaCl, de manera que en el tratamiento de NaCl más elevado se alcanzó el 70 % con respecto al control.

A diferencia de la raíz, en las muestras de tallo se observó un decremento en la cantidad de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  en la biomasa; ésta disminución tuvo una proporción similar a la acontecida para el  $\text{K}^+$ . Por otra parte, no se observó alguna modificación en la cantidad de iones de  $\text{Mg}^{2+}$  por peso seco en las muestras digeridas de éste órgano vegetal.

Tabla 4. Contenido iónico en tallos de *Vigna radiata* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ,  $\pm$  desviación estándar, nd: no hay diferencias estadísticas.

NaCl	$\text{Na}^+$ $\mu\text{mol/g PS}$	$\text{K}^+$ $\mu\text{mol/g PS}$	$\text{Mg}^{2+}$ mmol/g PS	$\text{Ca}^{2+}$ mmol/g PS	P mmol/g PS
0 mM	14.43 $\pm$ 7.16 d	2055.10 $\pm$ 168 a	0.170 $\pm$ 0.018 nd	0.225 $\pm$ 0.018 a	0.333 $\pm$ 0.015 b
50 mM	957.29 $\pm$ 89.22 c	1708.52 $\pm$ 55.36 b	0.152 $\pm$ 0.016 nd	0.205 $\pm$ 0.011 ab	0.394 $\pm$ 0.032 a
100 mM	1594.72 $\pm$ 21.46 b	1498.68 $\pm$ 55.22 bc	0.137 $\pm$ 0.025 nd	0.171 $\pm$ 0.025 bc	0.379 $\pm$ 0.015 ab
150 mM	1935.80 $\pm$ 134.95 a	1454.59 $\pm$ 57.28 c	0.155 $\pm$ 0.029 nd	0.159 $\pm$ 0.008 c	0.399 $\pm$ 0.024 a

#### Relaciones iónicas de hojas

Como parte del análisis de la distribución de iones en las plantas, se determinó la concentración de éstos en el área foliar total presente en el momento de la toma de muestra (siete días después de iniciar el tratamiento).

Los iones de  $\text{Na}^+$  en hojas de las plantas sometidas a salinidad, mostraron una relación diferente a los demás órganos vegetales (Tabla 5). A pesar de que la cantidad de  $\text{Na}^+$  foliar en las plantas sin NaCl es baja, con relación a la raíz y el tallo, en los tratamientos experimentales éste se acumuló conforme se incrementó la presencia de NaCl en el medio. La cantidad máxima de  $\text{Na}^+$  encontrada en hoja fue equiparable a la determinada en tallo, para la misma concentración de NaCl (150 mM).

La cantidad de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  encontrada en la biomasa de hojas de plantas salinizadas, disminuyó y se acumuló por debajo del 75, 65 y 60 % de la condición control para las plantas de los tratamientos de 50, 100 y 150 mM, respectivamente. Por su parte, la cantidad de iones de  $\text{K}^+$  mostraron un ligero incremento en la biomasa seca de hasta el 10 % respecto al control, aunque no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el control. De la misma manera, el  $\text{Mg}^{2+}$  y el P no mostraron variaciones en concentración que pudieran ser detectados por la prueba estadística empleada (Tabla 5).

Tabla 5. Contenido iónico en hojas de *Vigna radiata* sometidas a diferentes concentraciones de NaCl. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente

significativas de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ,  $\pm$  desviación estándar, nd: no hay diferencias estadísticas.

NaCl	Na <sup>+</sup> $\mu\text{mol/g PS}$	K <sup>+</sup> $\mu\text{mol/g PS}$	Mg <sup>2+</sup> mmol/g PS	Ca <sup>2+</sup> mmol/g PS	P mmol/g PS
0 mM	4.63 $\pm 1.90$ c	1342.98 $\pm 164.22$ nd	0.160 $\pm 0.002$ nd	0.367 $\pm 0.021$ a	0.555 $\pm 0.083$ nd
50 mM	174.09 $\pm 60.93$ c	1398.70 $\pm 60.47$ nd	0.134 $\pm 0.002$ nd	0.276 $\pm 0.004$ b	0.491 $\pm 0.005$ nd
100 mM	841.41 $\pm 437.41$ b	1460.07 $\pm 58.51$ nd	0.137 $\pm 0.004$ nd	0.240 $\pm 0.036$ b	0.477 $\pm 0.038$ nd
150 mM	1913.31 $\pm 67.06$ a	1483.76 $\pm 54.97$ nd	0.139 $\pm 0.022$ nd	0.223 $\pm 0.040$ b	0.588 $\pm 0.008$ nd

Es interesante notar que el ion Na<sup>+</sup>, considerado típicamente tóxico, en este trabajo presentó el máximo incremento por gramo de peso seco en raíz una vez que se expuso la planta a 50 mM de NaCl, mientras que en tallo y raíz el cambio fue paulatino. Cuando la situación cambia a 100 mM de NaCl en el medio se alcanza una saturación en raíz pero sigue incrementando en tallo y hoja, y cuando hay 150 mM de NaCl como tratamiento, la cantidad de Na<sup>+</sup> en raíz ya no cambia, en tallo presenta un ligero incremento, pero en hojas se presenta un incremento severo (Figura 11). Esto es, se acumula Na<sup>+</sup> en raíz de manera hiperbólica respecto a los tratamientos, de manera casi lineal en tallo y de manera exponencial en hoja por gramo de materia seca.

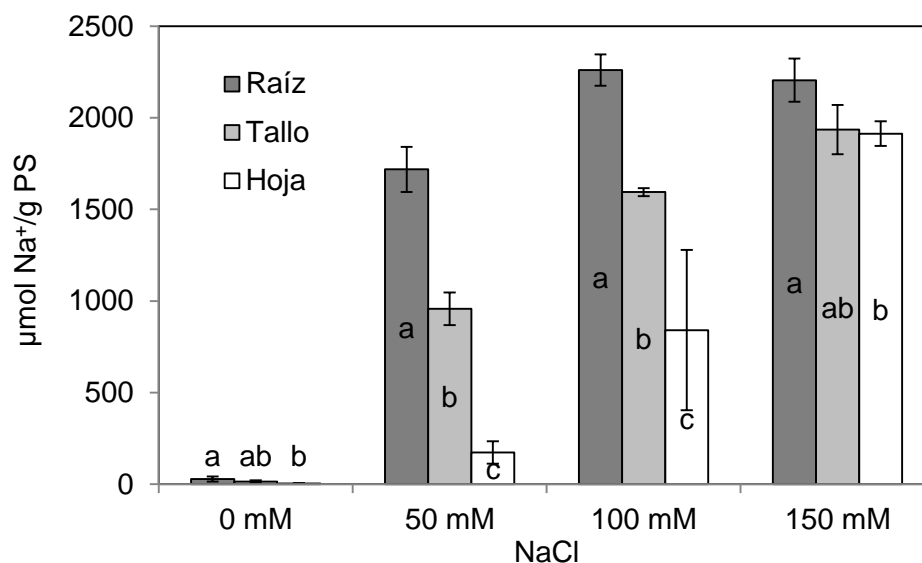


Figura 11. Efecto de la salinidad sobre el contenido de Na<sup>+</sup> en muestras de Raíz, Tallo y Hoja. Los datos numéricos son los mismos de las Tablas 3, 4 y 5. Las letras diferentes indican diferencias significativas para la concentración de Na<sup>+</sup> entre los diferentes órganos vegetales de cada tratamiento, de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ,  $\pm$  desviación estándar.

La tolerancia hacia el NaCl en distintas variedades de *Vigna unguiculata* parece estar relacionada con la distribución de los iones tóxicos en sus órganos. En las tolerantes y moderadamente tolerantes la mayor parte del Na<sup>+</sup> se localiza en las raíces, mientras que en las moderadamente sensibles y sensibles éste se encontró en el tallo (Murillo-Amador *et al.*, 2006). De acuerdo a los resultados obtenidos en éste estudio (Figura 11), en *Vigna radiata* la concentración de iones Na<sup>+</sup> es siempre mayor en raíz que en partes aéreas, en los distintos tratamientos.

En la Figura 12 se observa la relación entre el contenido total de los iones medidos por planta, con las distintas concentraciones de NaCl utilizadas. En ella se aprecia una diferencia marcada en la cantidad de cada tipo de ion. Esto es que, mientras se observa un incremento en la cantidad de iones de Na<sup>+</sup> en las plantas con salinidad hasta 100 mM de NaCl, la relación que mantienen los iones K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> es inversamente proporcional con todas las concentraciones de NaCl utilizada. La presencia de Mg<sup>2+</sup> y P también se vio reducida aunque a una razón menos acusada.

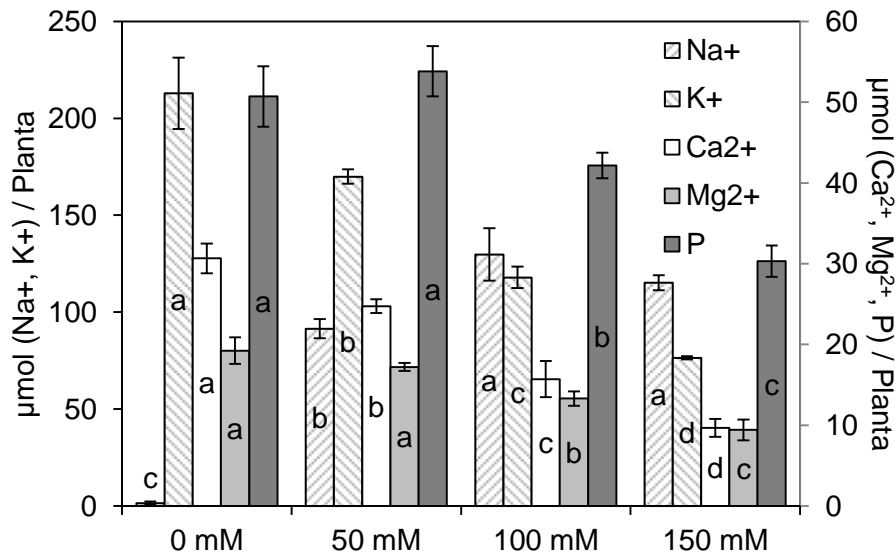


Figura 12. Efecto de la salinidad sobre la cantidad de iones presentes en el total de biomasa por planta. Para realizar los cálculos se utilizaron los datos de las Tablas 3, 4, 5 y Figura 8. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ,  $\pm$  desviación estándar.

Por su parte, la proporción de iones presentes en una fracción de biomasa, 1 g, arroja resultados diferentes (Figura 13). Ésta indica que la densidad general de iones de Na<sup>+</sup> en la biomasa de una planta completa incrementó proporcionalmente con el incremento de la salinidad; una relación menos marcada se observó con el P. Por su parte el K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> mostraron una disminución en esta

densidad, aunque la pérdida de éste último estuvo más acentuada. No se mostraron diferencias en la presencia de  $Mg^{2+}$  a nivel de planta completa.

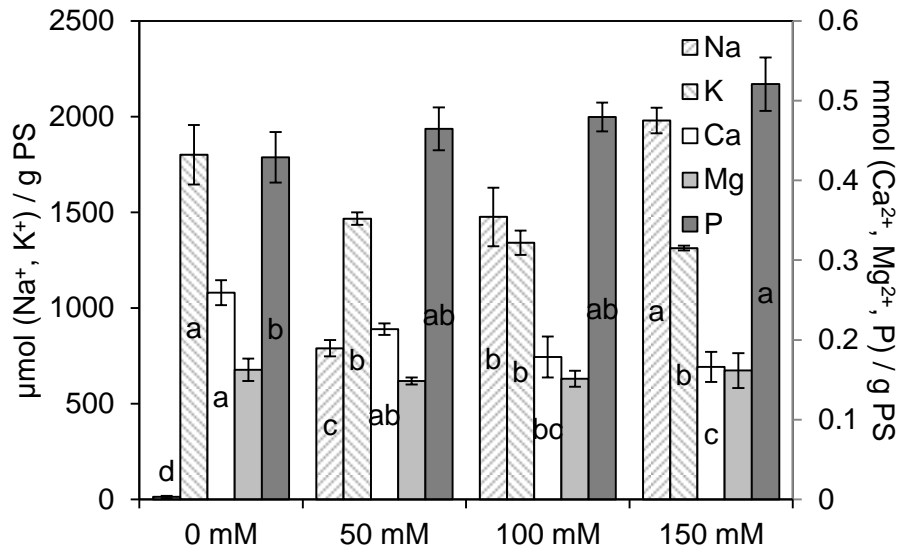


Figura 13. Efecto de la salinidad sobre la cantidad de iones presente en una unidad de biomasa seca total de plantas de *Vigna radiata*. Para realizar los cálculos se utilizaron los datos de las Tablas 3, 4, 5 y Figura 8. Las letras diferentes (en caso de estar presentes) indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ,  $\pm$  desviación estándar.

El desorden nutricional generado por el efecto de la salinidad con frecuencia resulta en un incremento del requerimiento interno de la planta para determinados elementos esenciales, además que no sólo existe una modificación en la forma en cómo son absorbidos los nutrientes disponibles, sino también en la forma en cómo son distribuidos espacialmente en la planta (Grattan y Grieve, 1999). Probablemente esto dé cuenta de las diferencias encontradas en las Tablas 3, 4 y 5, acerca de la cantidad de iones por unidad de biomasa respecto al total de iones que ingresaron a la planta (Figura 12 y Figura 13).

Un análisis más detallado de la presencia de iones en los órganos de las plantas indica que existen diferencias en su distribución por efecto de la salinidad (Figura 14). Estas gráficas ayudan a visualizar la modificación, causada por la salinidad, en la distribución iónica en los respectivos órganos. Mientras que el total de  $Na^+$  presente en una planta bajo diferentes concentraciones de tratamiento de NaCl incrementa significativamente (Figura 11), analizando el total de biomasa presente por individuo de *Vigna radiata* (Figura 8) y la cantidad de iones que ésta biomasa retiene (Tabla 3, Tabla 4 y Tabla 5) el porcentaje de iones presentes en cada órgano (Figura 14) no presentó el mismo patrón. La fracción de  $Na^+$  retenida en la raíz disminuye como porcentaje con el



tratamiento experimental de NaCl en el medio hidropónico empleado, mientras que en tallo no se modifica, pero en hojas llega a representar una fracción importante de hasta el 30 % de Na<sup>+</sup> presente en la planta. Éste efecto podría estar relacionado a la capacidad de retención para este ion por parte de la raíz, ya que si bien estadísticamente no hay una disminución importante entre los tratamientos de 50 y 100 mM de NaCl con el control, sí la hay entre los distintos tratamientos (Figura 14). En éste mismo órgano, raíz, la distribución del K<sup>+</sup> (Figura 14) es equiparable a la disminución en la concentración obtenida en base a biomasa (Tabla 3), de la misma forma que Mg<sup>2+</sup> y P. El Ca<sup>2+</sup> mostró un incremento como porcentaje en raíz del total en la planta, en contraposición cuando se mantiene una concentración constante en biomasa bajo los tratamientos con NaCl (Tabla 3). Esto indica que si bien disminuyó la entrada de Ca<sup>2+</sup> a la planta (Figura 12 y Figura 13), una fracción importante se mantuvo en las raíces, de manera que no se apreció algún cambio en su concentración por gramo de peso seco (Tabla 3), en consecuencia el aporte de éste ion a la parte aérea de la planta resultó disminuido (Figura 14, Tabla 4 y Tabla 5). Probablemente este efecto se deba a una falla en la fuerza impulsora del movimiento de este ion ya que es un mineral inmóvil.

Es importante notar que en tallo el porcentaje de iones, encontrados bajo los tratamientos utilizados, es similar para Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y P. Esto es, según la Figura 14, se distribuye la misma proporción de éstos iones en los tallos respecto del total ingresado a las plantas independientemente de la concentración de NaCl de tratamiento.

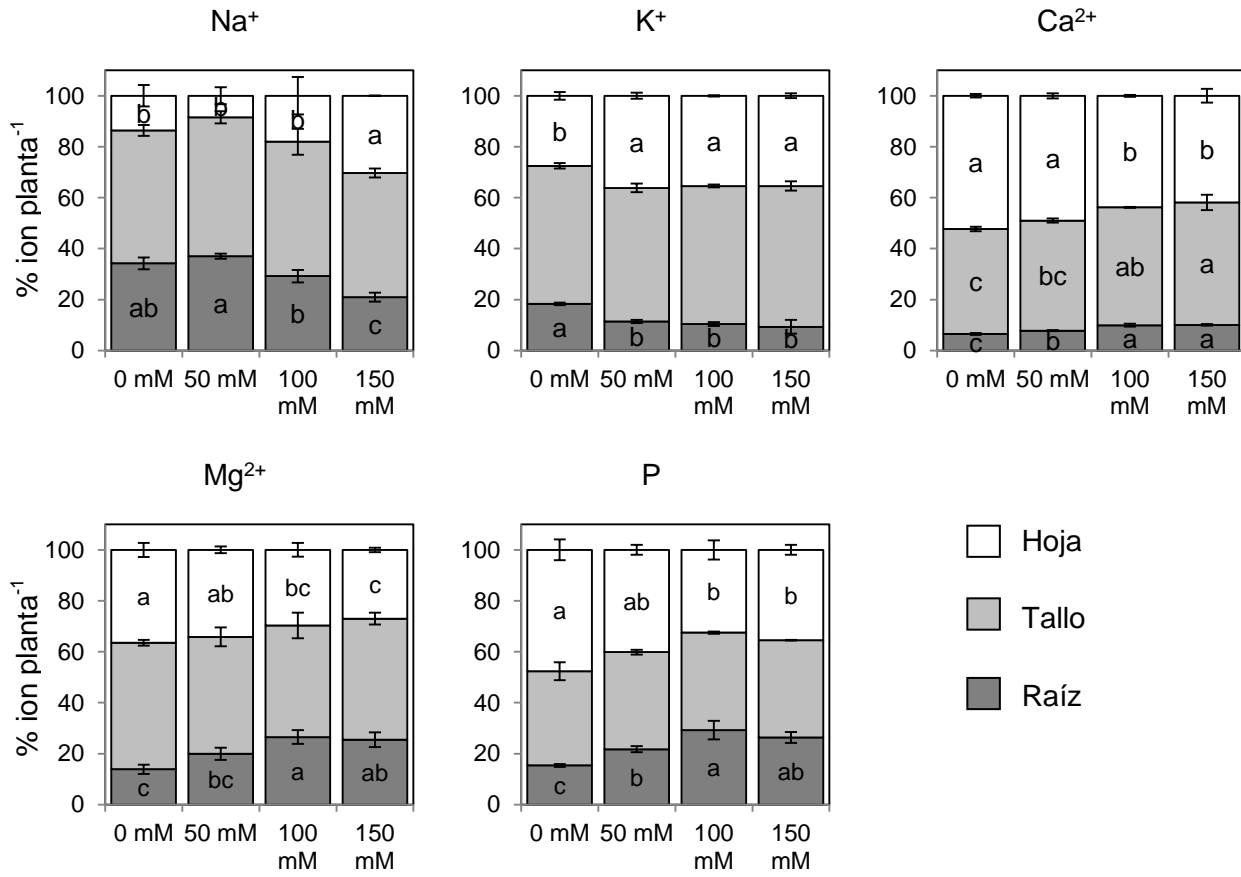


Figura 14. Distribución porcentual de los iones Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y P en los órganos Raíz, Tallo y Hoja de plantas de *Vigna radiata* salinizadas durante siete días. Las letras diferentes (en caso de estar presentes) indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ,  $\pm$  desviación estándar.

En un estudio en 2012, tres variedades de *Pistacia vera* de 21 días fueron salinizadas con 100, 200 y 300 mM de NaCl; la considerada como tolerante a salinidad presentó como características una menor afectación morfológica en el área foliar, en la altura de la planta, en el peso seco de raíz y tallo, y en la cantidad de clorofila total y azúcares solubles, así como una menor presencia de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> y mayor presencia de K<sup>+</sup> en tallo, con el incremento de la salinidad (Abbaspour *et al.*, 2012). Resultados como los anteriores señalan una relación de afectaciones según el grado de salinidad presente. Se sabe que frente al problema de salinidad el citoplasma de las plantas muestra una fuerte selectividad para potasio sobre sodio, magnesio sobre calcio, y fósforo sobre cloruro o nitrato (Gorham *et al.*, 1985); en otras palabras, altas concentraciones de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en el suelo producen relaciones extremas de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> y Cl<sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Grattan y Grieve, 1999).

Al obtener la proporción de  $[Na^+]/[K^+]$  (Figura 15) se observa que en raíz, ésta sobrepasa el valor de la unidad (equivalencia iónica) con el tratamiento de 50 mM de NaCl, mientras en tallo y hoja éste lo alcanza con el tratamiento de 100 mM y 150 mM, respectivamente. Con respecto al tratamiento con NaCl, en las raíces se observa un incremento progresivo de mayor magnitud en dicha relación con respecto a tallos y hojas. En un estudio experimental con un cultivo mutante de *Vigna radiata*, se demostró que una menor relación  $Na^+/K^+$  está relacionada con una mayor tolerancia a salinidad debido a un mayor consumo de  $K^+$ ; asimismo, la distribución de iones como  $Cl^-$ , además de  $Na^+$ , se restringen a la raíz como mecanismo regulatorio (Nandwal *et al.*, 2000).

Se ha mencionado también que el potasio tiene una gran importancia para el correcto cambio conformacional de ciertas enzimas, así como en la síntesis de proteínas y de NADPH (Wakeel *et al.*, 2011). Existen funciones específicas en las que el  $Na^+$  no puede reemplazar al  $K^+$ , aunque algunas funciones no específicas, como el mantenimiento osmótico entre la vacuola y el citoplasma, se pueden llevar a cabo indistintamente con  $K^+$  o  $Na^+$ , por lo que a éste último en ciertas circunstancias se le puede llamar nutrimento funcional; sin embargo, algunas funciones del  $K^+$  no pueden ser reemplazadas, como la activación por unión electrostática de al menos 60 enzimas relacionadas con el crecimiento (Wakeel *et al.*, 2011).

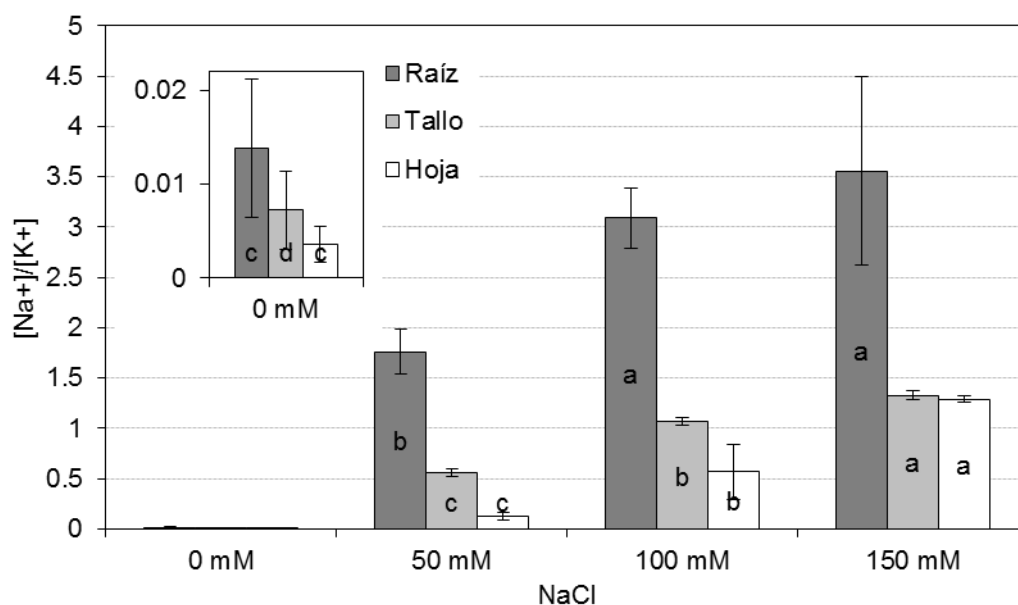


Figura 15. Efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de NaCl sobre la relación del contenido total de  $[Na^+]/[K^+]$  en órganos de *Vigna radiata*. En el inserto se muestra una amplificación para los valores del control. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ,  $\pm$  desviación estándar.

Con respecto a la relación de  $[Na^+]/[Ca^{2+}]$  y  $[Ca^{2+}]/[Mg^{2+}]$  (Figura 16), se puede observar el desplazamiento de iones conforme se incrementa la concentración de NaCl. Además de la entrada excesiva de  $Na^+$  a la biomasa, la relación de estos iones podría tener un impacto importante como participantes activos del potencial de membrana y por tanto a la permeabilidad al presentar carga y entonces modificar la asimilación de nutrimentos. Parece existir una relación entre el calcio y sodio disponibles para la raíz para que se presente la susceptibilidad al sodio (Lahaye y Epstein, 1971).

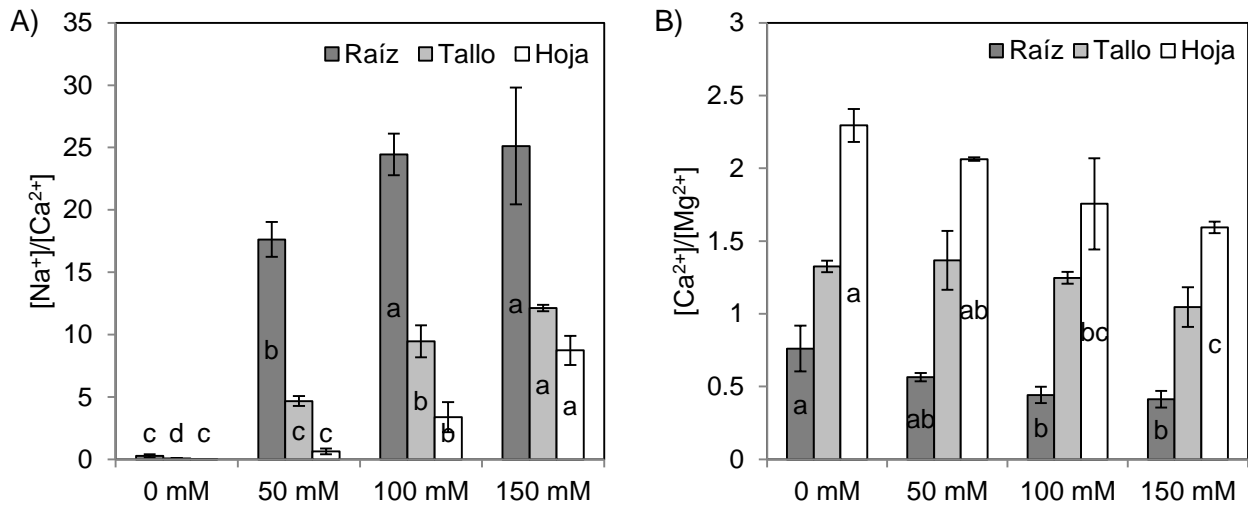


Figura 16. Efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de NaCl sobre la relación de  $[Na^+]/[Ca^{2+}]$  y  $[Ca^{2+}]/[Mg^{2+}]$  en raíz (R), tallo (T) y hoja (H) de *Vigna radiata*. Las letras diferentes (en caso de estar presentes) indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ,  $\pm$  desviación estándar.

Considerando que la zona de contacto con el medio hidropónico conteniendo el factor de estrés (NaCl) fue la raíz, hubo la misma oportunidad de ingreso de  $Na^+$  a la biomasa a saturaciones distintas (incluso concentraciones de 150 mM de NaCl, elevadas para *Vigna radiata*; Sehwat *et al.*, 2013). Al final, las raíces mostraron un incremento en la concentración interna de  $Na^+$  ante la concentración de NaCl más baja (Figura 11), pero con 100 y 150 mM de NaCl (Tabla 3) alcanzaron la misma concentración de éste ion entre ellas. La explicación podría estar condicionada por la ausencia en la regulación de entrada de dicho ion a las raíces, y por una limitante para su distribución entre raíz y tallo, y entre tallo y hojas. Esto indicaría una acumulación de  $Na^+$  en la raíz y un efecto de retención en tallo, de manera que se evita que éste llegue a las hojas. En ese caso la participación de los transportadores iónicos cobra la mayor relevancia por determinar la concentración de  $Na^+$  existente en los tejidos vasculares de conducción (probablemente HKT con afinidad a  $Na^+$  (*HKT2*); Horie *et al.*, 2009).

Los resultados anteriores concuerdan con los de distintas leguminosas, pues recurren a una estrategia de exclusión propia de plantas sensibles a la sal, restringiendo el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  al tallo para así evitar niveles altos en tejidos fotosintéticos (Aydi *et al.*, 2008).

Hay que tener en cuenta que la desinfección de las semillas se realizó con una solución de hipoclorito de sodio al 3 %. Durante el tiempo necesario para la germinación de las semillas se utilizó agua corriente de la llave que contiene cantidades apreciables de iones. Además, los pasos que se siguieron antes de comenzar el tratamiento salino contemplan un lapso de tiempo corto de estrés hídrico durante el trasplante de la cámara de germinación hacia los medios hidropónicos. Se ha reportado que el pretratamiento (aclimatación) mediante un factor estresante como el NaCl puede activar la maquinaria de defensa antioxidativa y de esa forma evitar un problema mayor cuando se presenta dicho factor de estrés nuevamente (Saha *et al.*, 2010).

### **Efecto del NaCl sobre el contenido de osmolitos compatibles**

Se ha observado que la concentración de Nitrogeno total en diferentes órganos de plantas de *Vigna radiata* salinizadas incrementa, probablemente como resultado de la síntesis de algunos aminoácidos en particular, o de la producción de compuestos de amonio cuaternario (Ashraf y Rasul, 1988).

Se ha estudiado la función de la prolina como un aminoácido con función protectora bajo condiciones de estrés en diversas plantas analizadas (Szabados y Savouré, 2009). Se ha discutido las distintas funciones que la prolina tiene frente a la tolerancia al estrés, entre ellos participa en el balance redox, pues su síntesis consume NADPH y su catálisis lo produce. Su acumulación permite un mejor control osmótico (Nandwal *et al.*, 2000) pues tiene función de osmoprotección ya que puede servir como chaperona molecular capaz de proteger la integridad de las proteínas, amortiguar el daño oxidativo al consumir oxígeno singulete o permitir la actividad de enzimas pertenecientes al metabolismo antioxidativo (Szabados y Savouré, 2009).

En el trabajo desarrollado, el tratamiento con NaCl sobre las plantas de *Vigna radiata* modificó la concentración de prolina en la biomasa fresca de los órganos evaluados (Figura 17). El efecto más evidente se observó en hojas, donde según la Figura 8, éstas presentaron una menor cantidad de biomasa, lo que podría relacionar la afectación al crecimiento con una mayor síntesis de prolina en presencia de una concentración alta de  $\text{Na}^+$  (Tabla 5). El cambio en el contenido de prolina es un indicador de estrés, pues podría ser consecuencia de la biosíntesis estimulada en el cloroplasto o la inhibición del catabolismo en la mitocondria teniendo función como osmolito (Zsigmond *et al.*, 2012).

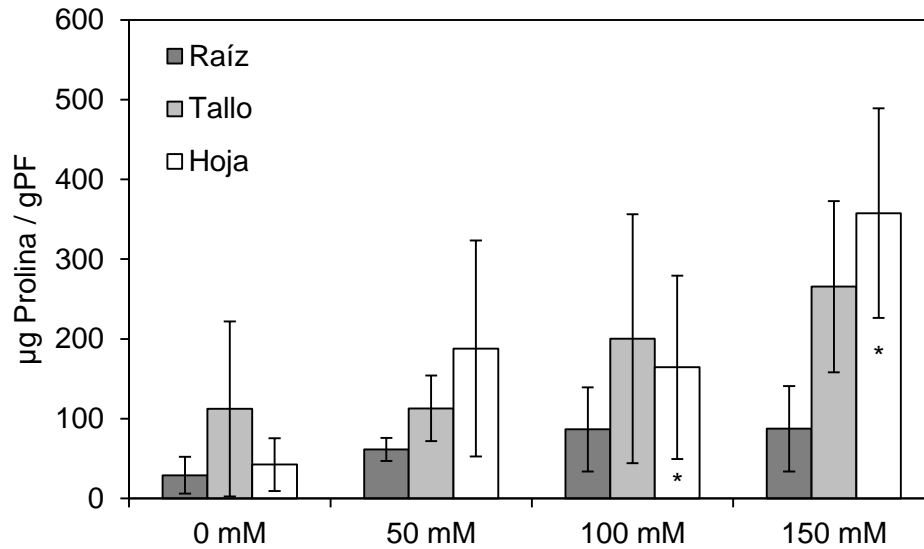


Figura 17. Efecto de la salinidad sobre el contenido de prolina en los órganos vegetales raíz, tallo y hoja de plantas de *Vigna radiata*. El análisis estadístico de medias permitió identificar al menos dos grupos con diferencias significativas frente al control que se marcan con un asterisco (\*),  $n=3$ ,  $\pm$  desviación estándar.

Por su parte, la cantidad de azúcares reductores totales se midió en hojas y raíces de las plántulas tratadas con NaCl. En la Figura 18 se muestra la cantidad de azúcares reductores totales presentes como efecto del tratamiento con NaCl. En hojas, el promedio de la cantidad de azúcares disminuyó en un 25 %, pero en raíces mostró una tendencia a incrementar respecto al tratamiento. Ésta correspondencia de aportación significativa de azúcares reductores a la raíz podría dar cuenta de la alta concentración de  $\text{Na}^+$  presente en este órgano, ya que se observó una alta densidad de sales como efecto de la salinidad (Tabla 3).

Considerando los datos obtenidos de biomasa (Figura 8), podría haber una relación entre el incremento de azúcares reductores en raíz con una disminución de biomasa. Una relación inversa se observa en hojas, donde el decremento en azúcares reductores, al menos hasta 100 mM de NaCl, presenta una disminución en biomasa. Este fenómeno se vuelve interesante en el sentido de estudiar la relación que mantiene la homeostasis energética a nivel sistemático. Donde los azúcares reductores podrían servir tanto como osmolitos compatibles como aportadores de energía a la raíz desde las hojas.

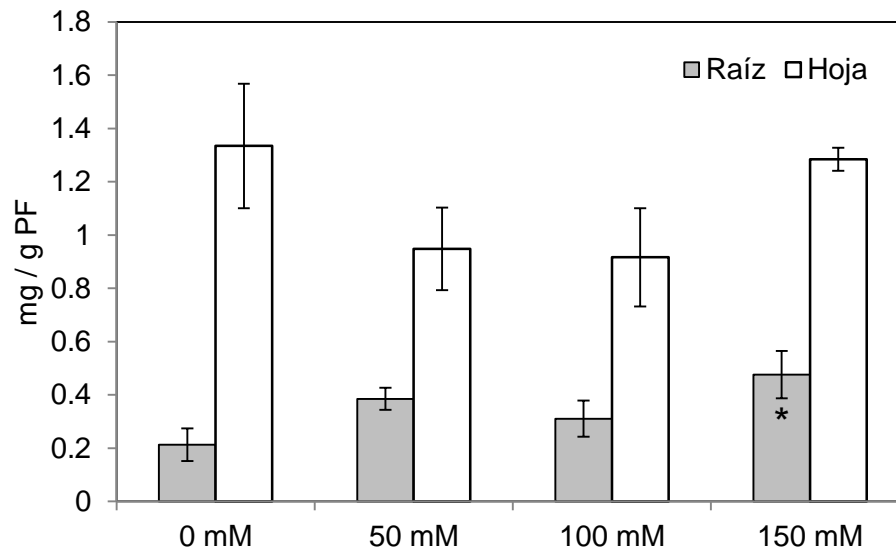


Figura 18. Contenido de azúcares reductores presentes en hoja y raíz de plántulas tratadas con NaCl en medio hidropónico. El análisis estadístico de medias identificó al menos un grupo con diferencias significativas frente al control, que se marca con un asterisco (\*).  $\pm$  Desviación estándar.

### Efecto del NaCl sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos

La concentración de los pigmentos fotosintéticos de hojas de *Vigna radiata* salinizada durante siete días se muestra en la Figura 19. La tendencia general de los tres pigmentos fue de aumentar con la concentración de 50 mM de NaCl (23, 20 y 34% para clorofila *a* y *b* y carotenoides totales, respectivamente) con respecto al control, disminuir en los tratamientos de 100 mM (16, 14 y 4%, mismo orden) y 150 mM (38, 25 y 27% de los mismos pigmentos). El análisis estadístico determinó que existen diferencias significativas entre los tratamientos probados, excepto en 100 mM de NaCl, en el cual la dispersión fue mayor; la pérdida de pigmentos por centímetro cuadrado foliar fue acentuada en la concentración de 150 mM de NaCl.

En un estudio con *Ricinus communis*, Li *et al.* (2010) encontraron que luego del tratamiento de 100 mM de NaCl durante siete días, hay una concentración de clorofilas mayor que el control. Estos autores argumentan que este fenómeno se debe a una estimulación por la salinización que promueve el crecimiento, mientras que los tratamientos con salinidad severa disminuyen su contenido de clorofilas al mismo tiempo que incrementa el de carotenoides totales. Se sabe que en condiciones no estresantes para un organismo con fotosíntesis oxigénica, los carotenoides ayudan a ampliar el espectro de absorción de energía electromagnética (Cuttris *et al.*, 2007).

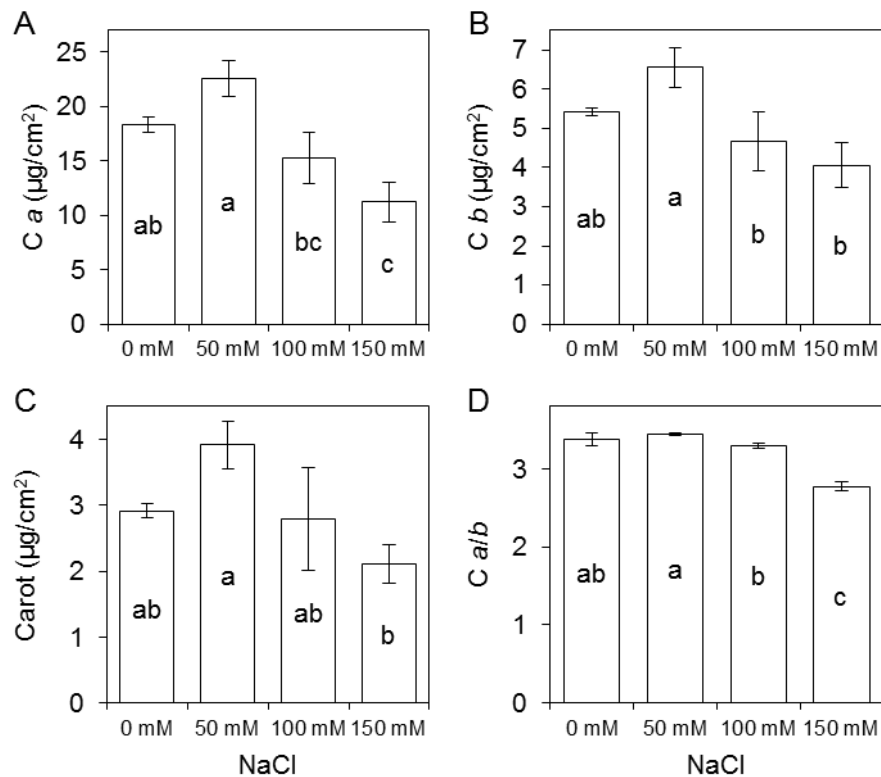


Figura 19. Efecto de la salinidad sobre la concentración de pigmentos fotosintéticos extraídos de hojas de *Vigna radiata* sometida a 0, 50, 100 y 150 mM de NaCl (Ca: Clorofila a, Cb: Clorofila b, Carot: Carotenoides totales, Ca/b: relación clorofila a/b). Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey,  $n=3$ ,  $p<0.05$ ,  $\pm$  desviación estándar.

La cantidad de clorofila específica (por unidad de biomasa seca foliar) muestra que no existen diferencias entre la cantidad de clorofila b y carotenoides como efecto del tratamiento. La tendencia de las medias podría indicar que el estrés salino en estas plantas ocasiona cambios metabólicos importantes que conducen a una menor cantidad de clorofila total por unidad de biomasa, al menos para la clorofila a (Figura 20) ya que existen diferencias en su contenido al menos entre los tratamientos de 100 y 150 mM de NaCl con respecto al control.



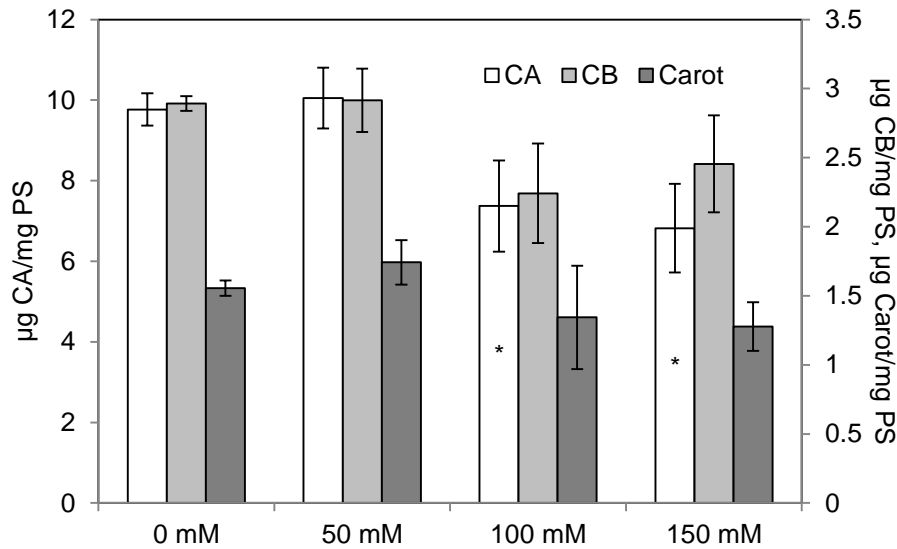


Figura 20. Efecto de la salinidad sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos por unidad de biomasa foliar (CA: Clorofila *a*, CB: Clorofila *b*, Carot: Carotenoides totales, PS: Peso Seco). Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas comparado con el control,  $n=3$ ,  $p<0.05$ ,  $\pm$  desviación estándar.

El efecto de la salinidad sobre la relación del contenido de clorofila *a* y *b* (Figura 19D) muestra que dicho valor no se modifica más allá del 2% del control durante la presencia de 50 y 100 mM de NaCl, pero disminuye 17% bajo condiciones de 150 mM de NaCl. Este cambio podría estar relacionado con modificaciones en la cantidad de pigmentos estructurales presentes en los complejos del fotosistema uno y dos.

Se ha discutido que la relación de la concentración de pigmentos ( $[\text{Clorofila } a]/[\text{Clorofila } b]$ ) refleja en gran medida la relación Fotosistema I/Fotosistema II (Anderson, 1986), por lo que los resultados pueden indicar una alteración en la proporción de los fotosistemas (Figura 19D).

Según el planteamiento de Anderson (1986), se sabe que el fotosistema dos es el que contiene la mayor proporción de clorofila *b*, de manera que existe una relación estequiométrica entre la concentración molar de clorofila *b* cuantificada y la concentración molar de unidades de fotosistema dos, con sus moléculas de clorofila *b* asociadas. De la misma forma, el total de clorofila *a* medido se encuentra en las inmediaciones proteicas del fotosistema dos y uno. También se ha determinado de la estructura tridimensional del fotosistema dos, que contiene 162 moléculas de clorofila *a* y 54 moléculas de clorofila *b* por unidad de fotosistema dos (Govindjee *et al.*, 2010), mientras que el fotosistema uno contiene 161 moléculas de clorofila *a* (Busch y Hippler, 2011).

En ese sentido se ha observado que el sistema fotosintético mantiene cierta flexibilidad que le permite ajustar la relación estequiométrica de los fotosistemas (Fotosistema II/Fotosistema I) frente a calidades de luz distintas, y que esto contribuye a mejorar la eficiencia cuántica de la fotosíntesis (Chow *et al.*, 1990). Además, estudios con distintos métodos para cuantificar los centros de reacción del fotosistema uno y dos, indican que el contenido de fotosistemas dos funcionales es mayor que el de PSI ( $PSII/PSI \approx 1.5 - 2$ ; Fan *et al.*, 2008).

En un estudio con dos variedades de arroz, Falqueto *et al.* (2010) observaron que dos variedades de arroz que difieren en alta y baja productividad agronómica, mostraron diferencias en la actividad fotosintética. Además que en distintos estados ontogénicos el fotosistema dos presenta diferencias en la eficiencia de uso de la energía o movilización de los asimilados más que en su capacidad de absorción de la luz. Adicionalmente, el fotosistema dos es más susceptible a fenómenos fotoinhibitorios, debido a un incremento en la presión de excitación, que llevan a cambios estructurales importantes (Vass, 2012).

En plantas de *Vicia faba* la proporción de clorofilas *a/b* aumenta de 1.8 en plantas sin salinizar hasta 4.5 en plantas sometidas a 240 mM de NaCl cuando se mide en los primeros diez días, pero en el tiempo en el que la toxicidad es severa y se observa la muerte del 40 % de las plantas (90 días de vida), esta relación se invierte encontrándose valores de 1.19 en plantas control y 0.07 en plantas con 240 mM de NaCl (Abdul, 2011).

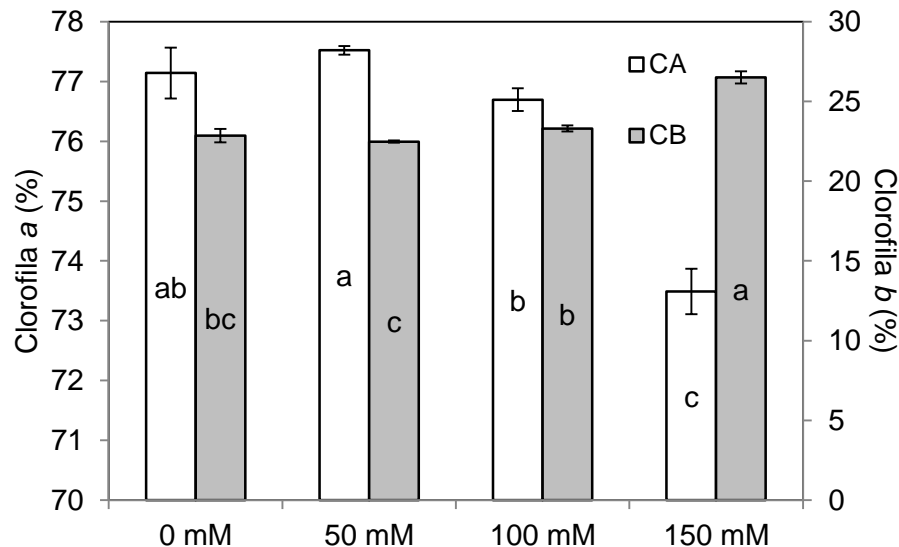


Figura 21. Efecto de la salinidad sobre la variación porcentual de clorofila *a* (CA) y clorofila *b* (CB) respecto de la cantidad total de clorofilas ( $100\% = \mu\text{gCAcm}^{-2} + \mu\text{gCBcm}^{-2}$ ). Las letras diferentes indican diferencias significativas,  $n=3$ ,  $p<0.05$ ,  $\pm$  desviación estándar.

La relación clorofila *a/b* se puede apreciar con un poco más de detalle en la Figura 21, donde se verifica que del total de clorofila por tratamiento, la razón de pérdida de clorofila *a* tiene una relación inversa con el tratamiento de NaCl, de la misma manera que la clorofila *b* (Figura 19 B). Sin embargo el porcentaje de pérdida del primer pigmento mantiene una magnitud mayor que el de clorofila *b*. Por lo anterior, la relación de estos pigmentos respecto al total de clorofilas, condujo a que la clorofila *b* pasara del 22 al 26 % en las muestras control a las salinizadas (Figura 21). Esto podría estar relacionado con la dinámica de biosíntesis y degradación de la clorofila *a* y *b*, ya que se sabe que en el ciclo de interconversión en el que participan estas dos moléculas, una mayor proporción de clorofila *b* mantiene una relación con la conversión aparente de clorofila *a* a *b*. Además que la presencia de clorofila *b* está relacionada con una mayor presencia de complejos cosechadores de luz (Tanaka y Tanaka, 2011). Se ha discutido la relación entre los niveles presentes de complejos cosechadores de luz del fotosistema dos y el apilamiento de las membranas tilacoidales (Anderson, 1986), ya que la estructura de los primeros es importante para que se lleven a cabo interacciones que llevan al apilamiento de las membranas tilacoidales para la formación de los *granum* (Pribil *et al.*, 2014). En relación a los resultados de la distribución iónica, se ha observado que distintos tipos de deficiencia nutrimental tienen claros efectos sobre la ultraestructura del cloroplasto (Hall *et al.*, 1972).

La disminución de clorofila *a* y *b*, puede deberse tanto a la afectación de la síntesis como a la tasa de degradación, sin embargo Vieira (2004) demostró en plantas de *Helianthus annuus* L., sometidas a salinidad gradualmente incrementada, que la pérdida de clorofilas es debida en mayor parte a su degradación, destacando que la actividad de síntesis de clorofila es afectada bajo salinidad severa. Concentraciones bajas de NaCl podrían afectar parcialmente la actividad de la clorofilasa, la causa del aumento en contenido, sin embargo, a concentraciones mayores de NaCl se afecta la síntesis de clorofila *a* en conjunto con la tasa de degradación alta, probablemente esto de cuenta de las relaciones observadas en la Figura 21.

La clorofila *b* se considera importante además por determinar la integridad de los complejos antena, al unir apoproteínas y ser blanco de proteasas para el inicio de su destrucción. El ciclo de interconversión clorofila *a* a *b* direcciona la proporción de estas dos clorofilas (Tanaka y Tanaka, 2011).

### **Efecto del NaCl sobre la respiración**

#### *Efecto del NaCl sobre la respiración en raíces*

La actividad respiratoria de mitocondrias de raíces de *Vigna radiata* se midió sólo en plántulas tratadas con 0, 50 y 100 mM de NaCl, debido a que la biomasa obtenida del tratamiento con 150

mM de NaCl no alcanzó el mínimo para realizar la extracción de mitocondrias de raíces. En este ensayo no se mostraron diferencias estadísticas significativas, además que no se pudo demostrar la actividad de la enzima Oxidasa alterna.

En la Figura 22 se observan trazos que representan las velocidades de respiración, los números indican la cantidad de oxígeno consumido por minuto por miligramo (mg) de proteínas. La relación entre los estados respiratorios tres y cuatro de acuerdo a los valores arrojados en la Figura 17, fue de 4.655 para el control, 5.278 para las raíces de plantas en 50 mM y 3.21 para las de 100 mM de NaCl. De acuerdo con ésta relación, existiría un mayor grado de acoplamiento en las membranas mitocondriales de raíces con el tratamiento de 50 mM de NaCl comparado con el control, mientras que con el tratamiento de 100 mM de NaCl se estaría perdiendo dicho acoplamiento.

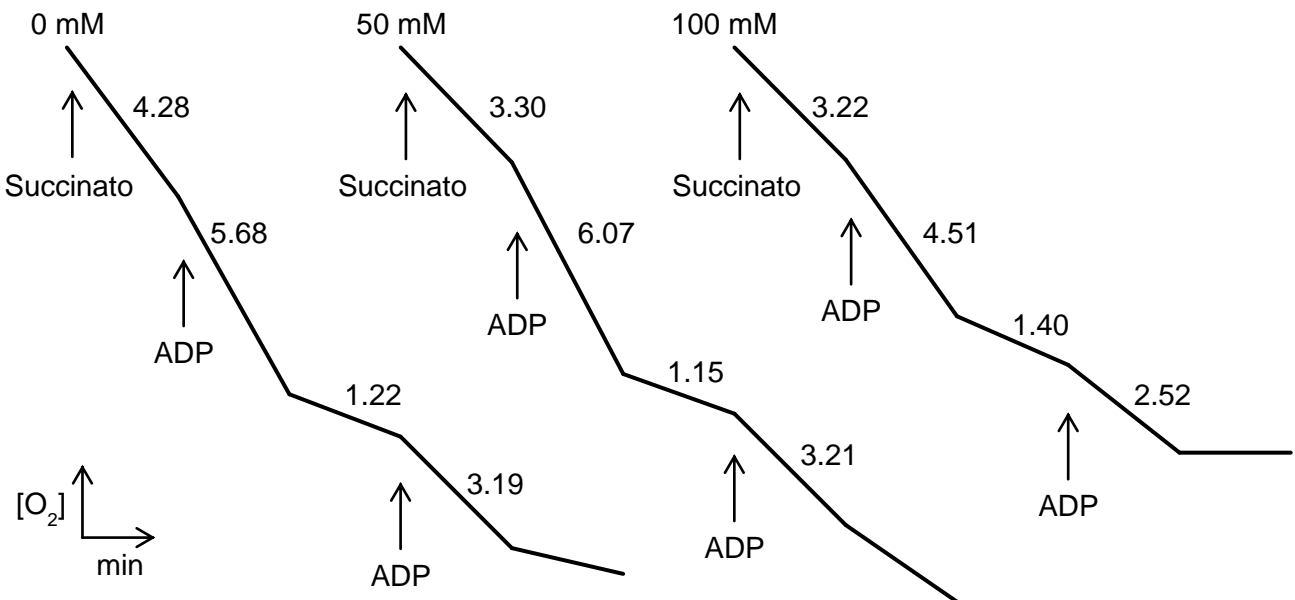


Figura 22. Tasa de liberación de oxígeno medido en mitocondrias aisladas de raíces de *Vigna radiata* sometida a salinidad durante siete días. La concentración de NaCl de tratamiento se indica en la parte superior de cada trazo; los números en el lado derecho de las líneas expresan la cantidad de oxígeno liberado por unidad de biomasa proteica por unidad de tiempo ( $\text{nmol O}_2 \mu\text{g prot}^{-1} \text{min}^{-1}$ ),  $n=3$ .

Se ha demostrado que en plántulas de arroz sometidas a distintos tipos de estrés, la disfuncionalidad de la cadena transportadora de electrones mitocondrial está relacionada a la acumulación de prolina. Lo anterior podría ser un mecanismo para evitar un desbalance en el estado redox relacionado a la proporción  $\text{NADH/NAD}^+$ , ya que la producción de prolina a partir de

ácidos orgánicos, como glutamato, podría servir como almacén de energía reductora en una forma no tóxica (Alia y Pardha, 1993).

#### *Efecto del NaCl sobre la respiración en hojas*

Se sabe que el consumo de oxígeno por mitocondrias de células fotosintéticas se modifica bajo condiciones metabólicas específicas, y que dichas variaciones son reflejo de la provisión de carbono de la fotosíntesis, del grado al cual el NADH fotorrespiratorio es consumido en la mitocondria, y del grado en el que el exceso de equivalentes redox fotosintéticos son exportados del cloroplasto, lo que revela su importancia durante la fotoinhibición (Atkin *et al.*, 2000).

Luego de un periodo de iluminación en discos de hoja, se obtuvo la tasa de consumo de oxígeno en obscuridad (Figura 23). Los resultados colectados en la Figura 23, muestran que durante el primer minuto de obscuridad, luego de someter los discos de hoja a una condición de luz de 400  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , la velocidad de consumo de oxígeno (Cons 1) incrementó como resultado de la exposición a salinidad. Transcurrido el primer minuto, la tasa de consumo de oxígeno disminuyó entre 60 y 80 % comparado con la tasa de consumo de oxígeno del primer minuto. Es interesante además que la velocidad de respiración después de un minuto de obscuridad en la cámara del oxímetro tiende a disminuir, a diferencia de la respiración en el primer minuto.

Durante la transición de la obscuridad a la luz en células fotosintéticas, se presentan grandes cambios en las tasas de respiración mitocondrial, especialmente debido a procesos fotorrespiratorios determinados por la condición fotosintética (Atkin *et al.*, 2000). El incremento en el consumo de oxígeno durante esta transición probablemente podría deberse al desacoplamiento en el transporte electrónico, así como a la actividad de rutas no fosforilativas como la NAD(P)H deshidrogenasas alternas (NDH), la oxidasa alterna (AOX) o proteínas desacoplantes (UCP, *Uncoupling Protein*). Estos mecanismos provocan un incremento en el transporte de electrones y en el consumo de oxígeno sin que se modifique la concentración de ATP (Møller, 2001). Se ha documentado también que en los cloroplastos existe una proteína con actividad oxidasa estimulada por luz, conocida como oxidasa terminal del plastoquinol (PTOX, *Plastoquinol Terminal Oxidase*, evolutivamente relacionada con la AOX; McDonald y Vanlerberghe, 2006), que puede tomar electrones a nivel de la poza de quinonas. Sin embargo la actividad y función de ésta enzima aún no son claras ya que los métodos para su estudio aún no se han establecido.

Nuestros resultados experimentales (Figura 23) muestran que una vez que transcurre el tiempo en obscuridad, los discos de hoja mantienen una tasa de consumo de oxígeno disminuida, por lo que

se puede decir que la tasa de consumo de oxígeno inicial una vez que se apaga la luz hasta la velocidad de consumo residual está estimulada por la luz.

El porcentaje que representa la respiración durante el primer minuto de oscuridad (Cons 1; Figura 23) respecto de la producción de oxígeno neta (Prod tot; Figura 23) se incrementó por efecto de la salinidad, desde un 6 % en el grupo control, hasta un 45 % en el tratamiento con 150 mM de NaCl. Éste consumo de oxígeno probablemente esté relacionado a la liberación de CO<sub>2</sub> fotorrespiratoria durante la oscuridad (proceso llamado estallido fotorrespiratorio postiluminatorio, *PIB*: *photorespiratory post-illumination burst*), ya que el tiempo necesario para que lleguen los productos fotorrespiratorios a las mitocondrias para ser oxidados es mayor que el necesario para que se detenga la carboxilación u oxigenación de la ribulosa 1,5-bisfosfato en la oscuridad (Atkin *et al.*, 2000).

La segunda fase de consumo de oxígeno, durante el segundo minuto de oscuridad (Cons 1+; Figura 23) no mostró cambios evidentes, aunque sí refleja la tasa de respiración una vez que se detiene la misma en presencia de luz. Por otra parte, la respiración en una planta podría tener dos finalidades: una relacionado al crecimiento, propio de la utilización de energía y poder reductor en biosíntesis, y otra al mantenimiento, debido mayormente al recambio de enzimas, el mantenimiento de membranas y/o al transporte de nutrientes (Ribas-Carbó *et al.*, 2008).

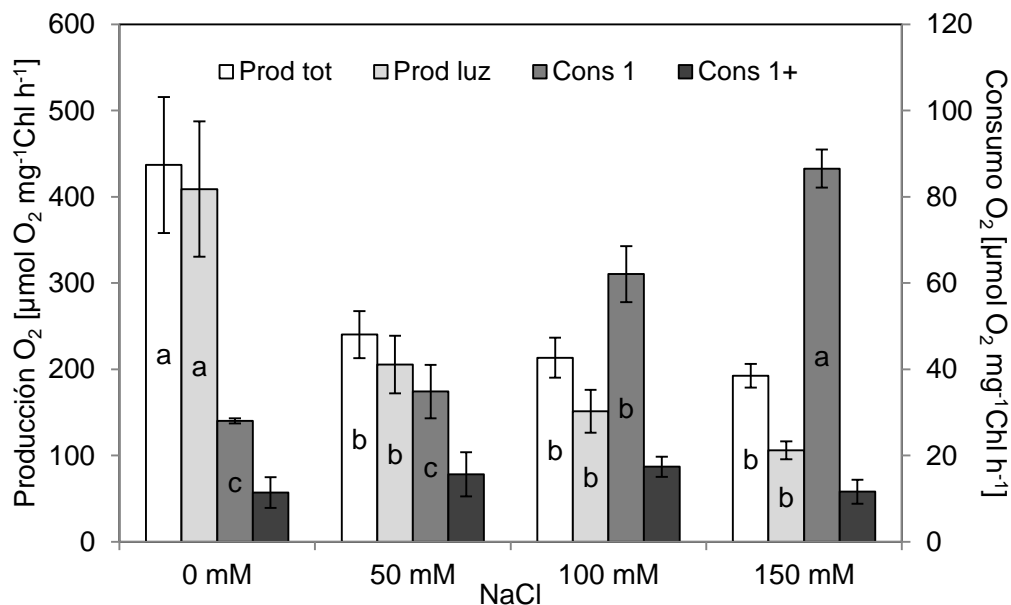


Figura 23. Efecto del NaCl sobre la velocidad de producción y consumo de oxígeno medido en hojas de *Vigna radiata*. **Prod tot**, suma de la velocidad de producción de oxígeno a la luz más la velocidad de consumo de oxígeno durante el primer minuto de oscuridad. **Prod luz**, velocidad de producción de oxígeno a la luz. **Cons 1**, velocidad

de consumo de oxígeno durante el primer minuto de obscuridad. **Cons 1+**, velocidad de consumo de oxígeno después del primer minuto de obscuridad. Letras diferentes (en caso de estar presentes) indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey,  $n=3$ ,  $p<0.05$ ,  $\pm$  desviación estándar.

La salinidad tiene un impacto negativo importante sobre la actividad *in vitro* de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos de raíces de plantas de *Vigna radiata* salinizadas (González-Moreno *et al.*, 2002; Saha *et al.*, 2012) probablemente como resultado de las interacciones iónicas al presentarse la entrada excesiva de  $\text{Na}^+$  y la salida de  $\text{K}^+$ . Los resultados obtenidos en la Figura 23 no sólo podrían deberse a modificaciones en el transporte electrónico en las membranas mitocondriales, sino también, probablemente, a modificaciones en el transporte de metabolitos hacia o de la mitocondria en hoja.

### **Efecto del NaCl sobre la fotosíntesis**

#### *Efecto del NaCl sobre la tasa de liberación de oxígeno*

Los datos de la velocidad de liberación de oxígeno obtenidos en este trabajo se muestran en la Figura 23 como la producción de oxígeno por unidad de clorofila y de tiempo. Estas velocidades consideran la velocidad de producción de oxígeno a la luz (Prod luz) por parte de la hoja, como el balance entre la producción neta de oxígeno durante la fotosíntesis y la fracción consumida por parte de la respiración durante la iluminación, además de la producción total (Prod tot), considerada como la suma de la producción de oxígeno a la luz más la tasa respiratoria durante el primer minuto de obscuridad (Figura 23).

De acuerdo a Maslenkova *et al.* (1995), tratamientos prolongados de salinidad modifican la composición de las membranas tilacoidales como reflejo del aumento en la presencia de centros de reacción  $\beta$ , mismos que podrían presentar un efecto de cooperatividad en la liberación de oxígeno, como mecanismo de resistencia hacia la salinidad. Lo anterior podría explicar por qué luego de la disminución de la producción de oxígeno en hojas sometidas a 50 mM de NaCl, los siguientes tratamientos no mostraron una diferencia significativa respecto a éste último; es decir, a pesar de incrementarse la tasa respiratoria, posterior a la iluminación, la velocidad de producción de oxígeno en hojas no se modificó entre los tratamientos (Prod tot, Figura 23).

La relación que guarda la respiración y la salinidad enmarca grandes diferencias frente a la resistencia al estrés salino (Jacoby *et al.*, 2011), aunque una limitante técnica importante del presente estudio fue el no poder discernir entre la respiración mitocondrial y los mecanismos

liberadores de energía en cloroplasto (Wilhelm y Selmar, 2011), además de otros procesos consumidores o productores de oxígeno.

*Efecto del NaCl sobre el transporte de electrones en tilacoides aislados*

La tasa de transporte de electrones entre el fotosistema II (PSII) y el fotosistema I (PSI), mostró una disminución en su actividad, mientras que la actividad de transporte electrónico a nivel de PSI se mantuvo sin cambios significativos (Figura 24).

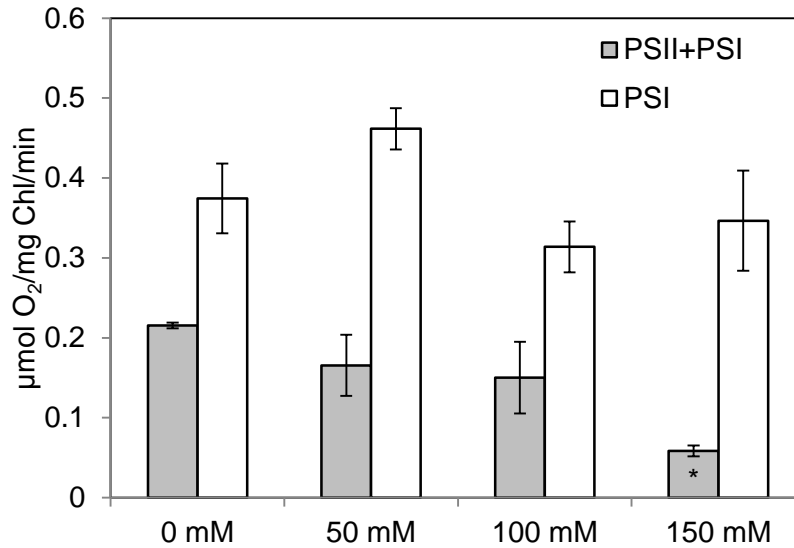


Figura 24. Efecto de la salinización sobre el transporte electrónico entre las unidades de fotosistema dos y uno (PSII+PSI) y sobre el fotosistema uno (PSI) de membranas tilacoidales aisladas de plantas de *Vigna radiata*. El análisis estadístico de medias permitió identificar al menos un grupo con diferencias significativas frente al control que se marca con un asterisco (\*),  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ,  $\pm$  desviación estándar.

De la Figura 24 se puede observar que la relación entre el transporte medido para el flujo entre la cadena completa (PSII+PSI) y el flujo a través del fotosistema (PSI) se vuelve más baja hacia el tratamiento de 150 mM de NaCl. Esta medición indica la capacidad del sistema para transportar electrones a lo largo de toda la cadena o únicamente a través del fotosistema uno, utilizando aceptores o donadores artificiales de electrones; es decir, la medición indica el potencial para realizar transporte electrónico lineal o cíclico. A partir de estos resultados se puede deducir que la funcionalidad del sistema completo podría modificarse *in vivo*.



*Efecto del NaCl sobre la utilización energética en muestras acondicionadas a la luz*

De acuerdo al protocolo descrito en el apartado de *Métodos*, la señal de fluorescencia registrada bajo condiciones de adaptación a la obscuridad y a la luz, mostró comportamientos distintos (Tabla 6). Es interesante observar que el promedio de la señal de fluorescencia en adaptación a la luz ( $F_s$ ) incrementó con el tratamiento de NaCl, mientras que la señal de fluorescencia máxima a la luz ( $F_m'$ ) permaneció invariable con el tratamiento salino (Tabla 6). Esto indica que otros mecanismos de disipación energética, además de los detectados por fluorescencia, modifican la utilización de la energía mediante disipación; probablemente estos mecanismos mantengan una eficiencia mayor para la disipación energética.

Tabla 6. Parámetros de fluorescencia modulada (unidades relativas). Letras diferentes indican diferencias significativas,  $p < 0.5$ ,  $n = 10$ ,  $\pm$  desviación estándar. En  $F_o$  y  $F_s$  el asterisco (\*) indica diferencias significativas respecto al control. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de fluorescencia máxima a la obscuridad ( $F_m$ ) y fluorescencia máxima a la luz ( $F_m'$ ).

	$F_o$	$F_m$	$F_s$	$F_m'$	$F_o'$
0 mM	131 $\pm$ 11	680 $\pm$ 143	255 $\pm$ 47	385 $\pm$ 54	124 $\pm$ 15 a
50 mM	137 $\pm$ 12	735 $\pm$ 120	290 $\pm$ 46	414 $\pm$ 51	136 $\pm$ 10ab
100 mM	153 $\pm$ 22	683 $\pm$ 136	310 $\pm$ 55	404 $\pm$ 61	154 $\pm$ 20 b
150 mM	256 $\pm$ 48*	580 $\pm$ 214	344 $\pm$ 72*	383 $\pm$ 75	231 $\pm$ 48 c

Cualquier proceso que afecta la eficiencia de captura de energía de excitación por los centros de reacción, como la fotoinhibición y procesos de disipación energética no fotoquímica, modifica la velocidad de transporte electrónico a través de los centros del fotosistema dos; esto se observa como cambios en parámetros de fluorescencia, como  $F_v/F_m$  y  $F_q'/F_m'$  (ver *Materiales y métodos*; Genty *et al.*, 1989).

Las células pueden acumular pigmentos no fotosintéticos o modificar la relación entre los fotosistemas dos y los fotosistemas uno, y esto a su vez modificar la absorción de luz necesaria para el transporte electrónico. La relación de la producción de ATP y electrones para fijar  $CO_2$  está, entonces, condicionado por el transporte lineal de electrones bajo situaciones óptimas (Baker, 2008). Para poder calcular el valor de la tasa de transporte electrónico (ETR) es necesario obtener los valores de absorbancia de la hoja, además de la proporción que representa el fotosistema dos del total de unidades fotosintéticas. Debido a lo anterior se ha optado por utilizar el valor de ETR relativo (rETR), que es un buen indicador de cambios relativos en las tasas fotosintéticas, si las muestras tienen una absorción similar (Enríquez y Borowitzka, 2011).

Bajo las condiciones anteriores se calcularon distintos parámetros relacionados a la utilización energética en el fotosistema dos. El parámetro  $\Phi\text{PSII}$  ( $=F_q'/F_m'$ ) representa la eficiencia cuántica con que operan las unidades del fotosistema dos bajo una condición lumínica dada, por lo que al multiplicarlo por la densidad fotónica incidente se obtiene la tasa de transporte electrónico relativa ( $r\text{ETR} = \Phi\text{PSII} * \text{PAR}$ ). La relación  $F_v'/F_m'$  representa la capacidad máxima (o potencial) del sistema para utilizar energía bajo una condición de aclimatación a una densidad de flujo fotónico dada; las modificaciones estructurales que este parámetro puede indicar probablemente están dados por un cambio en la conformación del fotosistema dos, debido a que los valores de  $F_o$  y  $F_o'$  están relacionados a cambios de estado de transición entre I y II (Ruban y Johnson, 2009).

La medición de fluorescencia en presencia de luz actínica (Tabla 7) mostró que el rendimiento cuántico máximo para el fotosistema dos ( $\Phi\text{PSII}$ ), así como la tasa de transporte de electrones relativa ( $r\text{ETR}$ ) y la disipación fotoquímica de la energía a través de la fracción de centros de reacción abiertos para esa condición lumínica ( $qP$ ), disminuyeron con la presencia de NaCl en el medio hidropónico. A pesar de ello, la disipación energética no fotoquímica (NPQ) aumentó con respecto al control en el tratamiento de 50 mM, pero disminuyó en 100 y 150 mM de NaCl. Dado que NPQ indica la disipación de energía en forma de calor, su disminución con la presencia de NaCl podría indicar la utilización de mecanismos de relajación no térmicos.

Tabla 7. Parámetros energéticos obtenidos a partir del análisis del decaimiento de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* (Roháček, 2002). Las letras diferentes, si se encuentran, indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ,  $\pm$  desviación estándar.

NaCl	$F_v'/F_m'$	$\Phi\text{PSII}$	$qP$	$qNP$	NPQ	$r\text{ETR}$
0 mM	0.675 $\pm$ 0.030a	0.338 $\pm$ 0.069a	0.499 $\pm$ 0.092a	0.520 $\pm$ 0.073	0.757 $\pm$ 0.193	37.33 $\pm$ 7.58a
50 mM	0.667 $\pm$ 0.032a	0.302 $\pm$ 0.036a	0.454 $\pm$ 0.063ab	0.532 $\pm$ 0.032	0.767 $\pm$ 0.104	33.36 $\pm$ 3.91a
100 mM	0.609 $\pm$ 0.084a	0.229 $\pm$ 0.081b	0.374 $\pm$ 0.115bc	0.522 $\pm$ 0.040	0.678 $\pm$ 0.166	25.33 $\pm$ 8.98b
150 mM	0.391 $\pm$ 0.080b	0.103 $\pm$ 0.027c	0.273 $\pm$ 0.079c	0.516 $\pm$ 0.176	0.558 $\pm$ 0.452	11.39 $\pm$ 2.94c

Se conoce que los cambios fisiológicos conocidos como decaimiento no fotoquímico (*non-photochemical quenching*, NPQ) no están relacionados linealmente al aumento en valores de  $F_v'/F_m'$ , ya que éstos procesos fisiológicos no permiten una evaluación directa de cambios en la eficiencia operativa del PSII, que podrían ser atribuibles a cambios en el parámetro medido como NPQ (Baker *et al.*, 2007). En otras palabras, existe una relación entre el parámetro  $F_q'/F_m'$  y

$F_v'/F_m'$  (Figura 25), mientras que NPQ es explicado en términos diferentes a la eficiencia fotosintética.

La Figura 25 muestra la relación que mantienen diferentes parámetros de eficiencia cuántica del fotosistema dos. Se observa una relación directa entre los parámetros obtenidos del potencial fotoquímico (Figura 25 A), probablemente debido a que luego de una condición lumínica ( $F_v'/F_m'$ ), el fotosistema dos mantiene sus características estructurales en condiciones de oscuridad ( $F_v/F_m$ ), bajo los tratamientos de salinidad. Mientras que la relación de funcionalidad (Figura 25 B), bajo la misma luz actínica ( $\Phi_{PSII}$ ), no presenta el mismo comportamiento que su potencial ( $F_v'/F_m'$ ); esto podría estar relacionado a una modificación en la transferencia energética en las antenas en condiciones lumínicas, para rendir una funcionalidad más baja con el tratamiento de NaCl. Lo que se observa en las gráficas mencionadas es que aparentemente la salinidad no modifica de manera importante los parámetros estructurales, sino hasta el tratamiento con 150 mM de NaCl (Figura 25 A), pero si hay una modificación en la eficiencia operativa, donde se observa una caída del parámetro  $F_q'/F_m'$  en los tratamientos de salinidad. Es decir, la salinidad no provoca una modificación estructural importante (hasta 100 mM del tratamiento) en presencia de luz, pero sí una modificación en la utilización energética, una vez que la luz enciende mecanismos regulatorios (Figura 25 B).

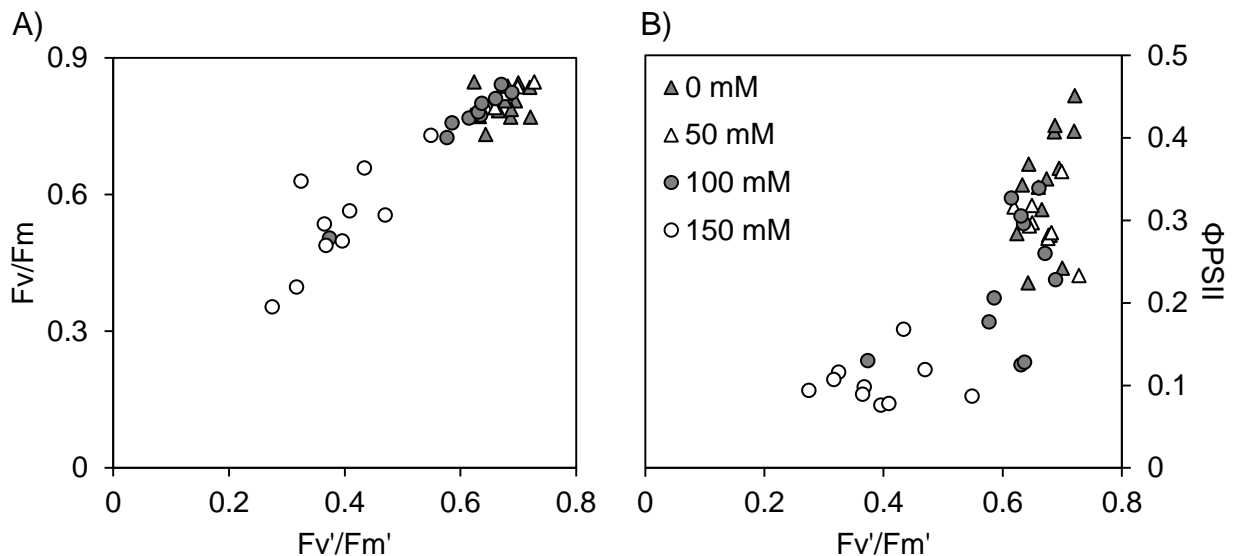


Figura 25. Efecto de la salinidad sobre la relación entre el potencial fotoquímico del fotosistema dos bajo condiciones lumínicas ( $F_v'/F_m'$ ) y el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria ( $F_v/F_m$ ) (A) y la eficiencia cuántica operativa medida ( $\Phi_{PSII}=F_q'/F_m'$ ) (B) de plantas de *Vigna radiata*. Cada símbolo representa un dato medido de una planta.

Otros estudios realizados con diferentes grados de radiación lumínica y disponibilidad de nitrógeno indican que la fotoinactivación del PSII está correlacionada linealmente con la magnitud de exceso de energía (aquella que no es utilizada en trabajo fotoquímico ni liberado como calor), y que esta correlación no es afectada por la capacidad de transporte electrónico fotosintético ni por la disipación de calor de la hoja (Kato *et al.*, 2003).

#### *Efecto del NaCl sobre la estructura del fotosistema dos*

El estudio del efecto de la salinidad sobre la estructura fotosintética, consideró analizar el registro del incremento polifásico de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a*, luego de obscurecer la muestra, durante al menos 15 minutos, para observar el arranque del transporte electrónico en el fotosistema dos. En la Figura 26 se muestra el promedio de las curvas polifásicas de fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema dos, obtenidas de la medición de las hojas cotiledonares intactas de plántulas de *Vigna radiata* sometidas a salinidad durante siete días.

El incremento en emisión de fluorescencia de la clorofila *a* es reflejo del cierre transitorio de los centros de reacción en el tiempo, por efecto de un pulso de luz saturante aplicado a muestras preacondicionadas a la obscuridad. De manera que en la obscuridad, una vez que la cadena transportadora de electrones está vacía, el pulso de luz saturante ( $3000 \mu\text{mol de fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) provoca que los componentes de la cadena pasen a un estado reducido debido al transporte electrónico impulsado por la luz. A su vez, dado que existe una diferencia entre los tiempos de transporte entre cada componente de la cadena (Tóth, 2006), las gráficas tienen un comportamiento polifásico característico, que consiste de dos fases intermedias entre el valor mínimo ( $O=F_o=F_{50} \mu\text{s}$ ) y el máximo ( $P=F_m \approx F_{300} \text{ ms}$ ), las fases J ( $J=F_j=F_2 \text{ ms}$ ) e I ( $I=F_i=F_{30} \text{ ms}$ ), respectivamente (Figura 26).

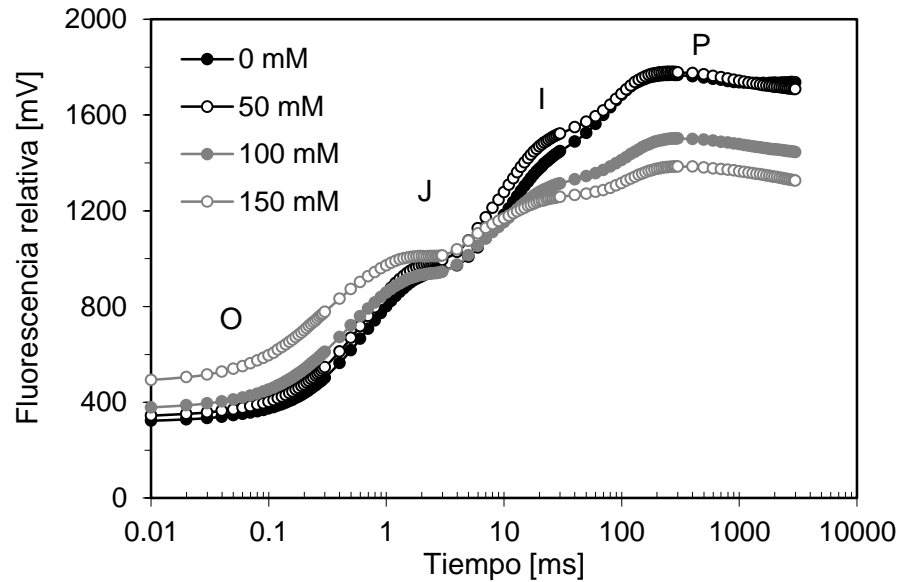


Figura 26. Efecto del tratamiento de NaCl sobre el incremento transitorio de la fluorescencia de la clorofila a. Nótese que el tiempo se encuentra graficado en tiempo logarítmico. Se indica con letras el nombre de cada fase de acuerdo al modelo desarrollado por Strasser y Strasser (1995). Las curvas representan el promedio de siete mediciones para cada tratamiento.

El nivel de fluorescencia inicial ( $F_o$ ) está relacionado con la fracción energética disipada por parte de la antena, de manera basal, mientras que el nivel de fluorescencia máxima ( $F_m$ ) se alcanza cuando el total de centros de reacción se cierran como efecto de la cantidad excesiva de energía que entra al sistema. En plantas, bajo las mejores condiciones encontradas, el nivel de  $F_m$  suele ser 5.95 veces mayor que el de  $F_o$ ; es decir, la eficiencia cuántica máxima para el fotosistema dos ( $1 - F_o/F_m$ ) encontrada para hojas es de  $0.832 \pm 0.004$  (Björkman y Demmig, 1987).

Como efecto del tratamiento con concentraciones de NaCl de 100 y 150 mM, el nivel de la fluorescencia mínima o inicial ( $F_o$ ) resultó incrementado, mientras que se redujo la fluorescencia máxima ( $F_m$ ; Tabla 6). En la Figura 26 se muestran los promedios de los trazos en escala de tiempo logarítmico frente a las unidades relativas de fluorescencia registradas. De estas dos fases, la  $F_o$  está relacionada con el estado del complejo antena, ya que ésta se produce cuando los centros de reacción se encuentran abiertos en un momento tan breve que aceptan excitones sin que haya una limitante en esta dirección, por lo que el incremento numérico implica que existe una transferencia energética deficiente entre los complejos antena y los centros de reacción. Mientras que la  $F_m$  representa la capacidad de los fotosistemas para el manejo de la energía, su disminución podría implicar la utilización de mecanismos de relajación energética a nivel del fotosistema dos, o bien la disminución en la frecuencia de unidades del fotosistemas dos (Tabla 8).

Dinç *et al.* (2012) demostraron que no existe una relación directa entre la variación en la cantidad de clorofila y los niveles de fluorescencia en hoja, sino que más bien la relación se da entre la relación de clorofilas *a* respecto a *b* y el tamaño de la antena del fotosistema dos, que a su vez determina la intensidad de la señal de fluorescencia.

Los resultados de Li *et al.* (2010) indican que en presencia de salinidad un incremento en  $F_o$  y aumento en  $F_m$  está relacionado a un daño en el complejo cosechador de luz, mientras que un incremento en  $F_v/F_m$  en baja salinidad implica un incremento en la eficiencia de conversión energética del fotosistema dos. El decremento en los niveles de  $F_m$  y la fluorescencia en J, I y P puede estar relacionado a una inhibición en el transporte electrónico en el lado donador del PSII, que podría llevar a una acumulación de  $P680^+$  o a un decremento del tamaño del pool de  $QA^-$  (Mehta *et al.*, 2010).

Mehta *et al.* (2010) estudiaron la recuperación de plantas de trigo sometidas a salinidad, y concluyeron que los centros de reacción reductores y no reductores de QA son interconvertibles, ya que el cambio en el tamaño de la heterogeneidad de la antena es temporal e irreversible, aunque ambos procesos no se acompañan siempre.

Una de las bases principales de la prueba JIP es que la fluorescencia variable (el incremento observado entre la fluorescencia inicial y la máxima) es equivalente a la reducción de QA en el tiempo, esto es  $V_t = [QA^-]/[QA_{total}]$  (Schansker *et al.*, 2014). Por lo anterior, los valores intermedios para las fases J e I suelen evaluarse realizando normalizaciones entre los extremos ( $F_o$  y  $F_m$ ) donde se indica que la fluorescencia variable en J ( $V_j$ ) evidencia la proporción de QA que acepta electrones a los dos milisegundos, respecto del total de QA que puede ser reducida en el punto máximo por el sistema (Tabla 8). Sin embargo se debe tener cuidado ya que además de la dependencia de la fluorescencia por el estado de reducción de QA, también existe una dependencia relacionada con el estado de oxidación del donador de electrones del PSII (estados S del complejo liberador de oxígeno; Delosme y Joliot, 2002).

Tabla 8. Efecto de la salinidad sobre los niveles de fluorescencia instantánea. Las letras diferentes indican diferencias significativas,  $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ,  $\pm$  desviación estándar.

NaCl	$F_o$	$V_k$	$V_j$	$V_i$	$F_m$
0 mM	345 $\pm$ 13 b	0.110 $\pm$ 0.014 c	0.408 $\pm$ 0.028 c	0.774 $\pm$ 0.028 b	1770 $\pm$ 60 a
50 mM	370 $\pm$ 20 b	0.124 $\pm$ 0.014 bc	0.429 $\pm$ 0.022 cb	0.817 $\pm$ 0.011 a	1780 $\pm$ 156 a
100 mM	399 $\pm$ 47 b	0.172 $\pm$ 0.047 b	0.467 $\pm$ 0.038 b	0.825 $\pm$ 0.022 a	1562 $\pm$ 163 b
150 mM	486 $\pm$ 60 a	0.241 $\pm$ 0.053 a	0.526 $\pm$ 0.044 a	0.836 $\pm$ 0.011 a	1555 $\pm$ 199 ab

En la Figura 27 se observa, respecto al incremento total, una modificación importante a nivel de llenado de QA. Esta parte de la curva de inducción de la fluorescencia es conocida como la fase luminosa del incremento polifásico, pues depende cinéticamente de la intensidad lumínica con que se hace trabajar el sistema (el paso de la fase O a la fase J). También se aprecia una modificación posterior a la fase J, es decir el paso de J a I, y de I a P, a ésta parte de la curva se le conoce como fase térmica, pues depende más bien del transporte electrónico entre los intermediarios de la cadena y los aceptores finales.

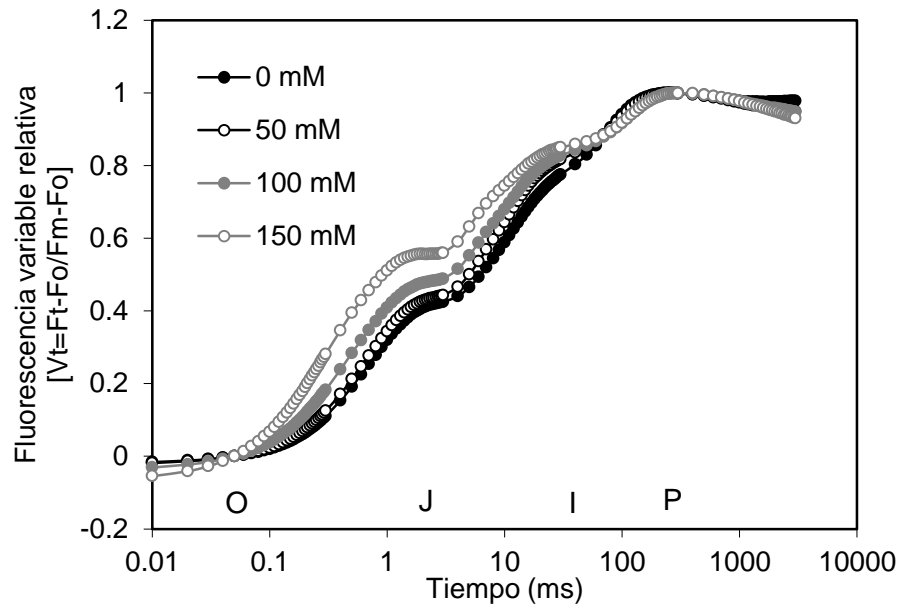


Figura 27. Efecto de la salinización sobre la dinámica de emisión de fluorescencia normalizada entre los puntos O y P, de acuerdo a la prueba JIP, en plantas de *Vigna radiata*.

Por otra parte, en el modelo está establecido que la pendiente inicial del incremento de la fluorescencia ( $M_o$ , Tabla 9 y Figura 28), está relacionada con la velocidad de cierre de los centros de reacción mediante la energía proveniente de las antenas. Este fenómeno está condicionado por diversos factores, como la cantidad de luz incidente sobre la muestra, el estado redox de los aceptores del fotosistema dos, el número de centros de reacción activos y la actividad del complejo liberador de oxígeno. En términos metodológicos, la cantidad de luz que llega al área iluminada por el fluorómetro es la misma en los protocolos utilizados en este experimento para todas las plantas, suficiente para saturar al sistema. El estado redox de las quinonas, que se deduce a partir del valor de  $V_j$  (Tabla 9), es determinante para el transporte electrónico; esto es, un valor mayor de  $V_j$  indica que el transporte a través de las quinonas condiciona transitoriamente el transporte electrónico a lo largo de la cadena, por lo que la capacidad para realizar el transporte disminuye. La actividad del complejo liberador de oxígeno se ha relacionado con la señal de fluorescencia en la fase K

(Strasser 1997), que cuando se normaliza con  $F_v$  ( $V_k$ , Tabla 9) muestra que hay un retraso en la aportación de electrones hacia QA, desde el lado donador del fotosistema dos (CLO; Tabla 9).

Tabla 9. Efecto del tratamiento con NaCl sobre parámetros estructurales obtenidos a partir de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a*.  $CLO = [1 - (V_k/V_j)]_{\text{experimental}} / [1 - (V_k/V_j)]_{\text{testigo}}$  (Fracción de complejos liberadores de oxígeno activos),  $Mo = 4(F_k - F_o) / (F_m - F_o)$  (Pendiente inicial del incremento polifásico de la fluorescencia de la clorofila *a*) y P2G (probabilidad de agrupamiento total; Strasser, 2004). Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ,  $\pm$  desviación estándar.

NaCl	Mo	CLO	RC/CS <sub>o</sub>	P2G
0 mM	0.442 $\pm 0.056$ c	1 $\pm 0.027$ a	258 $\pm 19$ a	0.159 $\pm 0.021$ nd
50 mM	0.500 $\pm 0.059$ cb	0.971 $\pm 0.038$ ab	252 $\pm 18$ ab	0.159 $\pm 0.029$ nd
100 mM	0.689 $\pm 0.190$ b	0.871 $\pm 0.102$ b	208 $\pm 40$ bc	0.178 $\pm 0.053$ nd
150 mM	0.967 $\pm 0.215$ a	0.746 $\pm 0.094$ c	185 $\pm 40$ c	0.177 $\pm 0.016$ nd

De acuerdo al modelo, el incremento de la fluorescencia inicial durante los primeros 300  $\mu$ s está relacionado a la velocidad de cierre de los centros de reacción, dado que en el inicio de la pendiente los sistemas se encuentran con la capacidad máxima para aceptar energía excitónica hacia los centros de reacción y el pool de QA se encuentra en su forma oxidada y con la capacidad máxima para aceptar electrones (Strasser, 2004). En la Figura 28 se observa una curva de fluorescencia de la clorofila *a* normalizada entre los 50  $\mu$ s y 2 ms, para observar el incremento en la pendiente inicial de las plantas de *Vigna radiata* control y las tratadas con NaCl durante siete días.



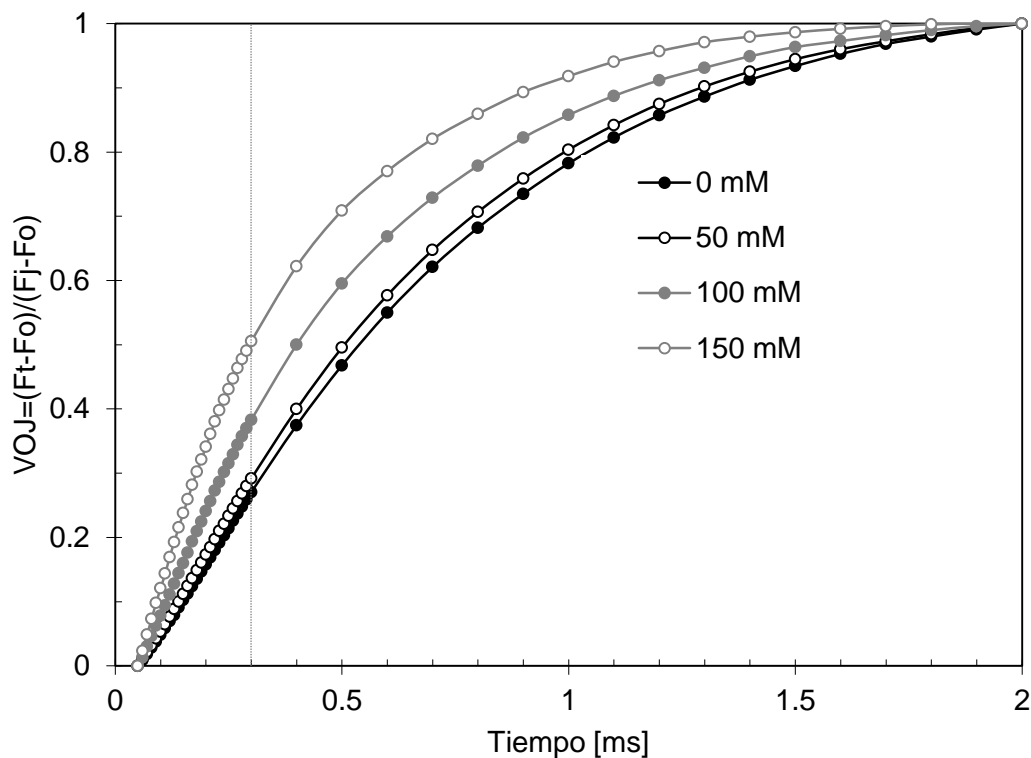


Figura 28. Efecto de la salinidad sobre el incremento inicial de la curva polifásica de la clorofila *a*, los datos se normalizaron entre O y J. Se indica el tiempo en escala lineal, además de una línea punteada vertical para el tiempo de 300  $\mu$ s.

Como resumen de las observaciones anteriores, la Figura 29 muestra la diferencia entre la fluorescencia variable (Figura 27) de las plantas tratadas con NaCl respecto a las del control. En esta figura se observa claramente el incremento de la banda K y del paso de J a I, lo que indica un retraso importante en la aportación de electrones al fotosistema dos y en la salida de éste, proporcional al incremento de NaCl en los tratamientos.

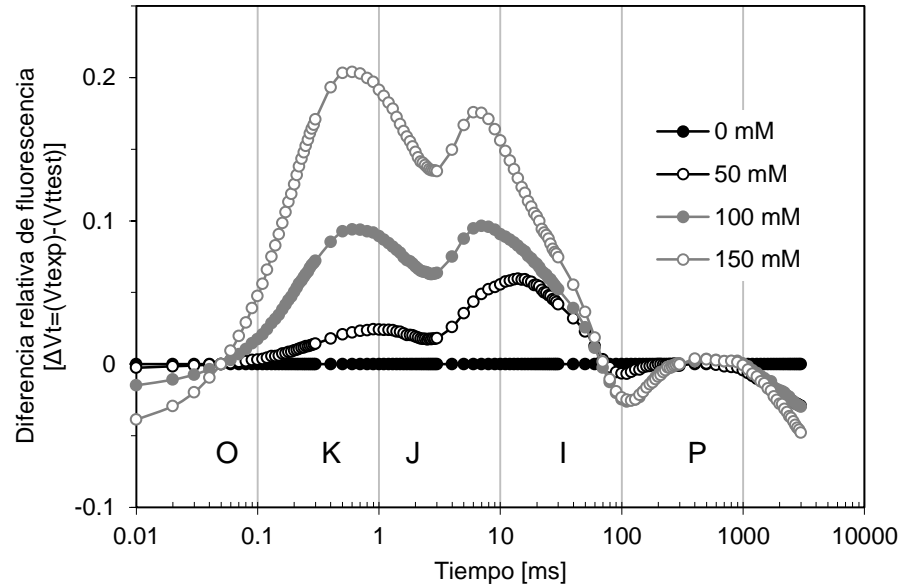


Figura 29. Diferencias en fluorescencia variable mostrando las bandas afectadas durante los tratamientos con NaCl (O, K, J, I y P de acuerdo al modelo desarrollado por Strasser, 2000).

Al normalizar los valores de fluorescencia entre las fases O y K (aproximadamente a los 150  $\mu$ s; Figura 30) es posible obtener una banda llamada L, que es indicadora de la conectividad energética o agrupamiento (Chen *et al.*, 2011). Siendo la conectividad menor cuando la banda L tiene una magnitud mayor (valores positivos de  $\Delta V_{OK}$ , Figura 30; P2G, Tabla 9) y como consecuencia una utilización menos eficiente de la energía de excitación y menor estabilidad del sistema (Yusuf *et al.*, 2010).

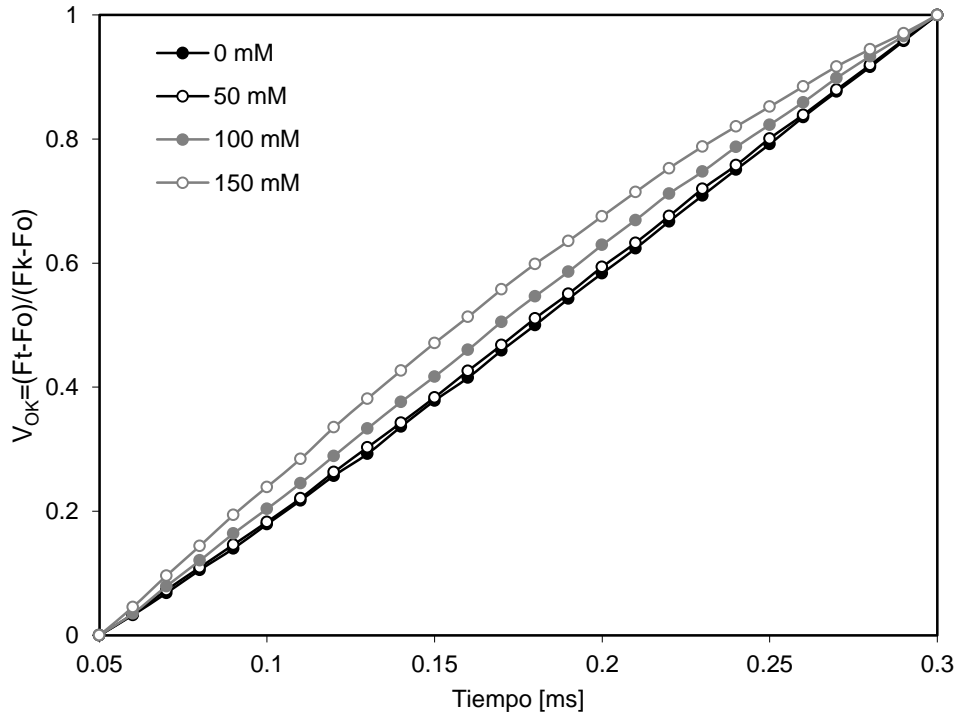


Figura 30. Efecto de la salinidad sobre la Banda L (50 a 300  $\mu$ s) del incremento polifásico de la fluorescencia de la clorofila *a*. Se observa en el eje de ordenadas de la izquierda el incremento desde 0 a 1. El eje vertical secundario muestra la diferencia entre las señales de fluorescencia variable y el control.

En ciertas ocasiones, debido a la interconectividad, se modifica la relación entre la eficiencia operativa del fotosistema dos medida ( $qP$ ) y el estado redox de QA, por lo que cambios en el primero sólo se pueden usar para relacionar cambios cualitativos en el estado redox de QA (Baker *et al.*, 2007).

Una medida de la conectividad entre las unidades del fotosistema dos se realiza a través del parámetro  $p$  (en ocasiones llamado P2G, Tabla 9) que está relacionado con el grado de agrupamiento o la probabilidad de transferencia de energía entre las unidades del PSII. Para ello se obtiene la constante de curvatura del incremento de fluorescencia  $C$ , y, luego con éste, el parámetro  $p$ :

$$C = \frac{W_E - W}{V_j W(1 - W_E)}$$

$$p = \frac{F_0 C}{F_m - F_0} \text{ (Strasser y Stirbet, 2001)}$$

Según Strasser y Stirbet (2001), que tienen como referencia para su modelo experimentos con DCMU,  $C$  es la constante de curvatura para el comportamiento hiperbólico de la relación mencionada en el párrafo anterior (en esta situación se considera que el incremento de  $t_0$  a  $t_j$  bajo una normalización por  $V_j$  tiene un comportamiento similar entre muestras con y sin inhibición con DCMU). La relación cuantitativa entre la fluorescencia variable relativa ( $V(t)$ ) y la fracción de PSII con QA reducida ( $B(t)$ ) tiene una forma hiperbólica, la constante para la hipérbola es  $C$ , que está determinada por la probabilidad de agrupamiento  $p$ .

$$V(t) = \frac{B(t)}{1 + C[1 - B(t)]}$$

Frecuentemente se asume que la fluorescencia variable relativa  $V(t)$  es igual a la fracción de centros de reacción cerrados  $B(t)$  (Figura 27). Una gráfica de  $V(t)$  se puede transformar en  $B(t)$  sólo si se conoce  $C$ , es decir, considerando que existe cooperatividad energética (Strasser y Stirbet, 2001). Si no existe conectividad energética entonces dicha relación se mantiene lineal. En la Figura 27 se aprecia el efecto de la salinidad sobre la conectividad para cada tratamiento, es decir sobre la fracción reducida de QA en el tiempo.

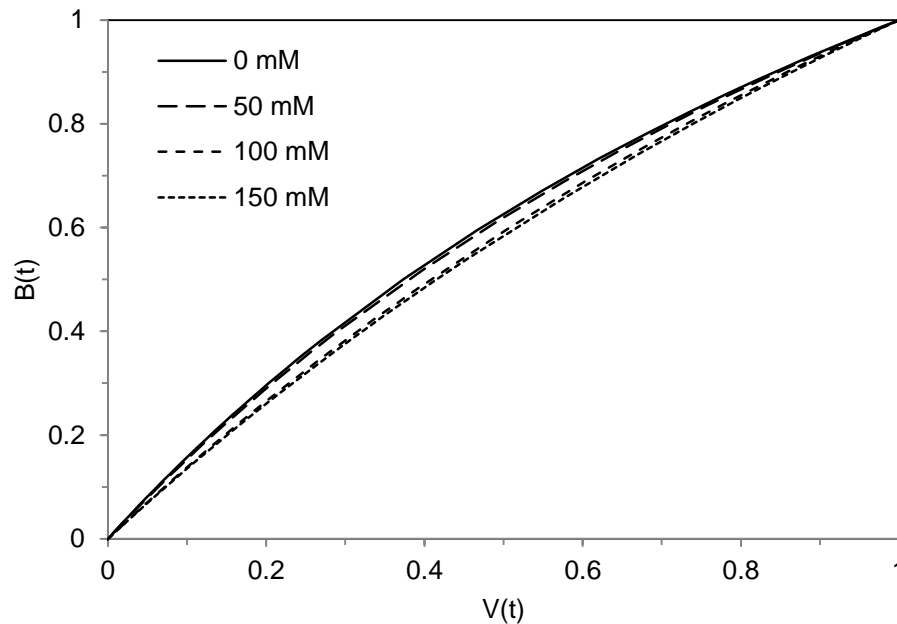


Figura 31. Efecto de la salinidad sobre la relación entre la fluorescencia variable relativa ( $V(t)$ ) y la fracción de centros de reacción con QA reducida ( $B(t)$ ).

El cambio en la curvatura de la Figura 31 indica una pérdida en la relación entre la distribución energética, de manera que se llega a explicar la dinámica de reducción de QA sin la conectividad, puesto que para unidades no conectadas  $V(t)=B(t)=QA^-(t)/QA+QA^-$  (Force *et al.*, 2003).

La conectividad se incorpora a los parámetros de RC de la prueba JIP (flujos específicos de energía: ABS/RC, TRo/RC, ETo/RC y Dlo/RC) multiplicándolos por el término  $(1+C)$ , aunque los datos obtenidos en el presente trabajo no presentan modificaciones en dichos flujos energéticos una vez que se realiza dicha transformación. Dado que la conectividad no modifica los parámetros de flujo fenomenológico, se puede utilizar una comparación del cambio ocurrido en la disipación energética a nivel de centro de reacción (Dlo/RC) sobre aquel que ocurre a nivel de sección cruzada del PSII (DI/CS) para monitorear cambios en la pérdida de conectividad (Force *et al.*, 2003).

De acuerdo con Schansker *et al.* (2005), la última fase del incremento transitorio de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* (I-P), está relacionada con la contribución del transporte electrónico de los últimos aceptores del fotosistema uno. La explicación es que en condiciones de oscuridad prolongada la enzima que acepta los electrones del fotosistema uno y reduce al  $NADP^+$  (Ferrodoxina- $NADP^+$  reductasa) se encuentra inactiva, de manera que existe un bloqueo transitorio en esta última fase del transporte electrónico, hasta que la exposición a la luz se estimula actividad de la enzima y restituye el transporte (Schansker *et al.*, 2006).

De acuerdo con el planteamiento anterior, en la Figura 32 se muestra la fase de I-P de las curvas normalizadas entre el cero y la unidad. En ésta gráfica muestra una comparación de las tasas de reducción del pool de aceptores finales de electrones y se indica el tiempo medio para que se lleve a cabo este evento con una línea que atraviesa las curvas. El inverso del tiempo medio representa, además, la constante de velocidad total que conduce a la reducción de los últimos aceptores de electrones (Yusuf *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos indican que el tratamiento de salinidad retrasa el transporte electrónico hacia el lado aceptor del fotosistema uno (Figura 27).

La última fase de la curva polifásica (inserto de la Figura 32), normalizada entre 0 e 1, refleja el tamaño del pool de aceptores finales de electrones finales en el lado aceptor del fotosistema uno (Yusuf *et al.*, 2010).

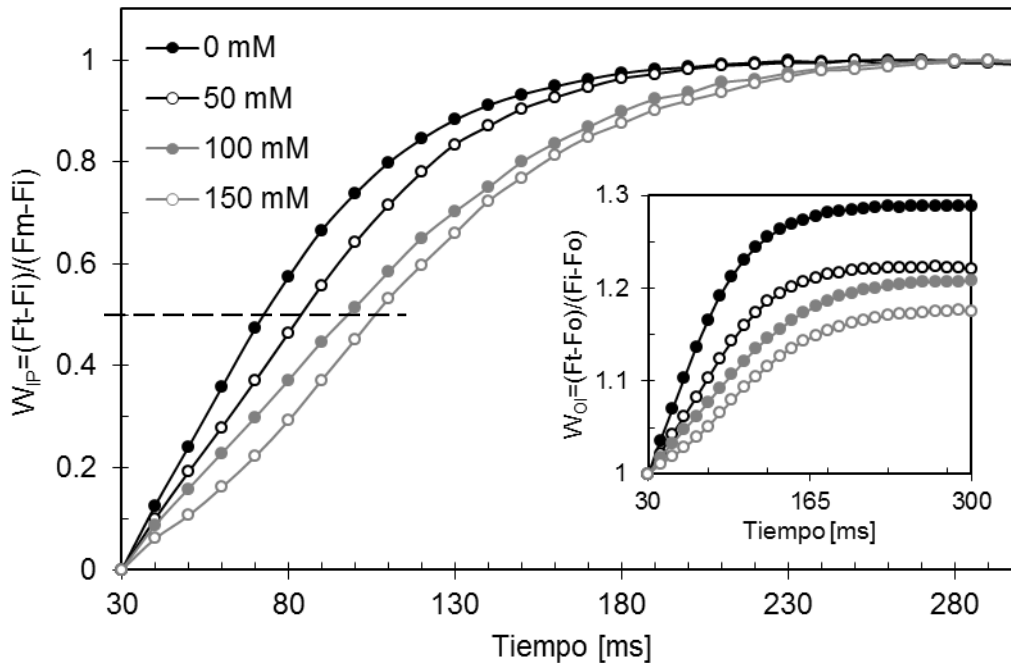


Figura 32. Banda IP normalizada entre las fases IP. En el inserto se muestra la banda I-P normalizada entre las fases OI.

El análisis de los flujos energéticos consistió en determinar el destino de la energía excitónica absorbida o aquella que pasó a través de los centros de reacción del fotosistema dos. En la Tabla 10 se observa que el número de centros de reacción activos ( $RC/ABS=(ABS/RC)^{-1}$ ) resultó menor con el tratamiento de NaCl. El incremento en  $TRo/RC$  indica que todas las QA que han sido reducidas no son capaces de reoxidarse de nuevo debido al estrés (Mehta *et al.*, 2010).

Tabla 10. Flujos energéticos específicos calculados de acuerdo al modelo de biomembranas de Strasser y Strasser (1995). Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ,  $n=7$ ,  $\pm$  desviación estándar.

NaCl	ABS/RC	TRo/RC	ETo/RC	DIo/RC
0 mM	1.342 $\pm 0.105$ c	1.079 $\pm 0.080$ c	0.637 $\pm 0.038$ c	0.262 $\pm 0.028$ b
50 mM	1.474 $\pm 0.152$ cb	1.163 $\pm 0.113$ bc	0.663 $\pm 0.065$ bc	0.31 $\pm 0.055$ b
100 mM	2.007 $\pm 0.567$ b	1.456 $\pm 0.298$ b	0.766 $\pm 0.112$ ab	0.551 $\pm 0.284$ b
150 mM	2.69 $\pm 0.515$ a	1.822 $\pm 0.275$ a	0.854 $\pm 0.076$ a	0.867 $\pm 0.291$ a

Las relaciones de los datos anteriores permitieron obtener la eficiencia cuántica para la fotoquímica primaria ( $\phi Po$ ) (Tabla 11), que disminuyó debido a que la absorción de fotones

aumentó en proporción respecto al atrapamiento por centro de reacción con los tratamientos de NaCl (Tabla 11). La eficiencia de transporte de electrones después de QA ( $\Psi_0$ ), así como la probabilidad de movimiento de electrones después de QA ( $\varphi E_0$ ) disminuyó con el tratamiento de NaCl. Esto confirma la afección a nivel de centros de reacción del fotosistema dos. Por otra parte el producto cuántico para la disipación energética por parte del sistema de antenas ( $\varphi D_0$ ) incrementó, indicando que existe una liberación de energía en una condición de obscuridad; es decir la salinidad lleva a una ineficiencia de carácter estructural. Ésta fracción energética disipada es importante porque contribuye a evitar un fotodaño mayor al aparato fotosintético debido a un exceso de energía lumínica o al impedimento en su manejo (Kato *et al.*, 2003). Se obtuvo además la probabilidad con que un electrón de los acarreadores intermedios podría ser transferido para reducir a los aceptores finales del lado aceptor del fotosistema uno ( $\delta R_0 = (1-V_i)/(1-V_j)$ ; Chen *et al.*, 2011), no encontrando diferencias importantes con el tratamiento (Tabla 11), pero sí en los resultados obtenidos en la figura 32.

Tabla 11. Rendimientos energéticos calculados de acuerdo al modelo de biomembranas de Strasser y Strasser (1995). Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ,  $n=7$ ,  $\pm$  desviación estándar.

NaCl	$\varphi P_0$	$\Psi_0$	$\varphi E_0$	$\varphi D_0$	$\delta R_0$
0 mM	0.804 $\pm 0.009$ a	0.591 $\pm 0.028$ a	0.476 $\pm 0.027$ a	0.195 $\pm 0.009$ b	0.382 $\pm 0.047$ a
50 mM	0.790 $\pm 0.023$ a	0.570 $\pm 0.022$ ab	0.451 $\pm 0.030$ ab	0.209 $\pm 0.023$ b	0.321 $\pm 0.027$ b
100 mM	0.739 $\pm 0.060$ ab	0.532 $\pm 0.038$ b	0.394 $\pm 0.055$ b	0.260 $\pm 0.060$ ab	0.326 $\pm 0.027$ b
150 mM	0.683 $\pm 0.056$ b	0.473 $\pm 0.044$ c	0.324 $\pm 0.052$ c	0.316 $\pm 0.056$ a	0.345 $\pm 0.016$ ab

Zaghdoudi *et al.* (2011) afirman que igual que el fotosistema dos, el fotosistema uno podría presentar fotoinhibición en el lado aceptor, además de que el recambio de péptidos del fotosistema uno es más lento que en el fotosistema dos; sin embargo, estos autores no discuten acerca de si este fenómeno podría contribuir a la señal de fluorescencia del fotosistema dos, finalmente el fenómeno de fotoinhibición se encuentra adosado a la disminución del valor  $F_v/F_m$ .

El Índice de rendimiento potencial para la conservación de la energía absorbida (Plabs) y las fuerzas de manejo (DF) (Tabla 12) disminuyeron a causa de la inactivación de los centros de reacción y de la disminución de la eficiencia cuántica máxima para la fotoquímica primaria ( $F_v/F_m$ ), con los tratamientos de NaCl. El retraso en el transporte electrónico desde el lado donador del fotosistema II pudo determinar la aportación de electrones a la cadena, y de esta manera ser causante del bloqueo aparente del transporte de electrones (Figura 27 y Figura 28).

Tabla 12. Efecto de la salinidad sobre los componentes del índice de rendimiento (IP) en base a la absorción por centro de reacción. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ,  $\pm$  desviación estándar.

NaCl	$\gamma RC/1 - \gamma RC$	$\phi Po/(1 - \phi Po)$	$\Psi o/(1 - \Psi o)$	Plabs	DF
0 mM	7.49 $\pm 0.591$ a	4.127 $\pm 0.250$ a	1.459 $\pm 0.180$ a	45.674 $\pm 10.805$ a	3.798 $\pm 0.226$ a
50 mM	6.845 $\pm 0.693$ ab	3.82 $\pm 0.543$ ab	1.334 $\pm 0.121$ ab	35.555 $\pm 10.147$ ab	3.535 $\pm 0.288$ ab
100 mM	5.339 $\pm 1.505$ bc	2.992 $\pm 0.809$ bc	1.15 $\pm 0.178$ bc	20.563 $\pm 12.522$ bc	2.83 $\pm 0.705$ bc
150 mM	3.822 $\pm 0.738$ c	2.228 $\pm 0.530$ c	0.908 $\pm 0.171$ c	8.321 $\pm 4.526$ c	1.996 $\pm 0.582$ c

Además cuando se considera la capacidad de reducir a los últimos aceptores de electrones de la cadena, el lado aceptor del fotosistema uno, se puede obtener el índice de rendimiento total. La contribución de los componentes del índice de rendimiento potencial para la conservación de la energía absorbida a través de la reducción de los aceptores finales de la cadena de transporte ( $PI_{total}$ ; Figura 29) se calcula desde la relación de las formas reducidas de los componentes de éste parámetro ( $\gamma RC$ ,  $\phi Po$ ,  $\Psi o$  y  $\delta Ro$ ) respecto a las formas oxidadas ( $1 - \gamma RC$ ,  $1 - \phi Po$ ,  $1 - \Psi o$  y  $1 - \delta Ro$ ). Un descenso dramático del parámetro  $PI_{total}$  resulta no sólo de la pérdida de la actividad del fotosistema dos, sino además de la estructura y función del fotosistema uno (Li *et al.*, 2010).

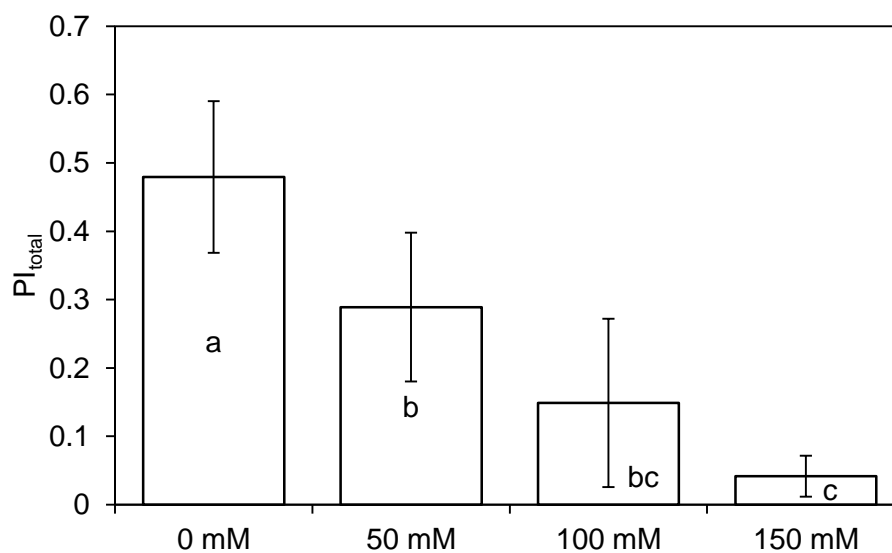


Figura 33. Efecto de la salinidad sobre el índice de rendimiento total ( $PI_{total}$ ). Las letras diferentes indican diferencias significativas,  $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ,  $\pm$  desviación estándar.

La salinidad tiene efectos diferentes sobre los flujos energéticos y los rendimientos energéticos (Tabla 10 y Tabla 11), observándose que el atrapamiento (TR) respecto a la absorción (ABS) o por centro de reacción (RC) se comporta de manera distinta. Es decir, probablemente los flujos energéticos hayan incrementado en respuesta a una menor frecuencia de centros de reacción



funcionales, por lo que la energía proveniente de las antenas para el atrapamiento y transporte disminuyó debido a una disipación energética mayor presente en ésta estructura.

La fluorescencia de la clorofila *a*, que permite observar cambios en el transporte electrónico (González *et al.*, 2008), prueba que la principal afección, en esta planta sometida a salinidad, se presenta en el lado donador del PSII. La afección pudo deberse al incremento del complejo antena, simultáneo a una inactivación de los centros de reacción; es decir, en la fase fotoquímica del modelo de fluorescencia. Los resultados obtenidos por Kalaji *et al.*, (2011), después de aplicar 120 mM de NaCl durante 7 días sobre dos variedades de *Hordeum vulgare* (considerado tolerante a la sal), muestran un daño a los centros de reacción y por ello al transporte electrónico. En el trabajo de Mehta *et al.* (2010b), hojas de trigo sumergidas por una hora en NaCl (0.1 a 0.5 M NaCl) mostraron un decremento del complejo antena e inactivación de los centros de reacción, además de que el índice de rendimiento (PI) disminuyó. Estos hechos apuntan al papel del NaCl como un componente iónico que afecta en mayor medida la estructura del PSII. Mehta (2010a) afirma que la salinidad afecta la heterogeneidad de los centros reductores del PSII, es decir la interconversión de los centros de reacción activos a inactivos; sin embargo, esto es válido para el trigo que se considera una especie tolerante a la salinidad, no así el frijol mungo.

## Conclusiones

Se observó una afectación en el crecimiento de plantas de *Vigna radiata* tratada con NaCl, en relación a una menor acumulación de biomasa y tasa de elongación. Este fenómeno afecta de manera diferente la velocidad de elongación de los órganos raíz, tallo y hoja, resultando el primero afectado en menor medida que el último.

El metabolismo y distribución iónica de plántulas de *Vigna radiata* mostró diferencias cuando se sometió a un tratamiento con NaCl bajo tres concentraciones distintas durante siete días en un medio hidropónico. En estas condiciones, *Vigna radiata* utilizó la biomasa de la raíz como sistema de retención de la entrada de Na<sup>+</sup> a la planta. Aún se desconoce a detalle como ocurre esto, pero lo más probable es que esté relacionado con la afectación a la elongación de la raíz y al incremento en la presencia de osmolitos compatibles como prolina a concentraciones de NaCl mayores a 100 mM.

El tratamiento con NaCl provocó el ingreso de Na<sup>+</sup> a la biomasa de la planta, a pesar de no haber modificaciones en el ingreso de K<sup>+</sup> entre los tratamientos utilizados. La aportación de Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y P a la parte aérea de las plantas disminuyó como efecto del tratamiento, además que existe una ralentización en el crecimiento de las mismas probablemente por un retraso en el aporte de nutrimentos. En hojas, además de la cantidad de Na<sup>+</sup> incorporada, la disminución de la concentración de Ca<sup>2+</sup> pudo haber repercutido en la actividad metabólica.

Bajo las condiciones experimentales utilizadas, la relación de pigmentos fotosintéticos en hojas se modificó al presentar un decremento en la proporción de clorofilas *a* respecto de *b*. Esta relación tuvo su mayor impacto en el tratamiento con 150 mM de NaCl, concentraciones menores no presentaron diferencias con el control. En contraste con la actividad fotosintética de liberación de oxígeno a la luz, que resultó afectada en presencia de concentraciones de 50 mM de NaCl, el consumo de oxígeno durante el periodo de obscuridad mostró una estimulación luego del tratamiento de 100 mM de NaCl, de manera que la relación entre la tasa respiratoria y fotosintética se modifica como efecto de la salinidad.

La actividad del transporte electrónico tilacoidal tuvo su principal afectación en el fotosistema dos. Medido en condiciones *in vivo*, la actividad fotoquímica mostró un efecto fotoinhibitorio en el fotosistema dos, y como causa más probable de éste fenómeno se encontró una afectación en el complejo liberador de oxígeno y una alta energización desde el sistema de antenas hasta el pool de quinonas. Estas afectaciones estructurales repercutieron en la funcionalidad del sistema provocando una ineficiencia fotoquímica. Una fracción energética de disipación en las antenas se podría relacionar con la inactivación de los centros de reacción.

## Bibliografía

- Abbaspour, H., Afshari, H. y Abdel-Wahhab, M. A. 2012. Influence of salt stress on growth, pigments, soluble sugars and ion accumulation in three pistachio cultivars. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6 (12):2468 – 2473.
- Abdul, A. Q. 2011. Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Science*. 10:7 – 15.
- Abogadallah, G. M. 2010. Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signaling & Behavior*. 5(4): 369–374.
- Adam, S. M. 1994. Handbook of Plant and Crop Stress. Pessarakli, M. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. pp 227–246.
- Alia y Pardha, S. A. 1993. Suppression in mitochondrial electron transport is the prime cause behind stress induced proline accumulation. *Biochemical and biophysical research communications*. 193: 54-58.
- Anderson, J. M. 1986. Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. *Annual Review of Plant Physiology*. 37: 93 – 136.
- Apse, M. P. y Blumwald, E. 2007. Na<sup>+</sup> transport in plants. *FEBS Letters*. 581: 2247-2254.
- Arnon, D. I. y Stout, P. R. 1939. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiology*. 14: 371–375.
- Ashraf, M. y Rasul, E. 1988. Salt tolerance of mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) at two growth stages. *Plant and soil*. 110: 63-67.
- Ashraf, M. and Harris, P. J. C. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant science*. 166: 3-16
- Atkin, O. K., Millar, A. H., Gardeström, P. y Day, D. A. 2000. Photosynthesis, Carbohydrate Metabolism and Respiration in Leaves of Higher Plants. En: *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Leegood, R. C., Sharkey, T. D. y von Caemmerer, S. (Eds.). Pp 153 – 175. Dordrecht: Kluwer.
- Aydi, S., Sassi, S. y Abdelly, C. 2008. Growth, nitrogen fixation and ion distribution in *Medicago truncatula* subjected to salt stress. *Plant Soil*. 312:59 – 67.

- Baker, N. R., Harbinson, J. y Kramer, D. M. 2007. Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves. *Plant, Cell and Environment*. 30:1107 – 1125.
- Baker, N. R. 2008. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 80-113.
- Barrera, J., Suárez, D. and Melgarejo, L. M. 2010. Análisis de crecimiento en plantas. En: Experimentos en Fisiología Vegetal. Melgarejo, L. M. (ed.) Bogotá, Universidad Nacional de Colombia.
- Björkman, O. y Demmig, B. 1987. Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*. 170:489-504.
- Bolhar-Nordenkamp, H. R. y Öquist, G. 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research- In photosynthesis and Production in a Changing Environment: A field and laboratory Manual (D.O.Hall, J.M.D. Scurlock, H.R. Bolhar – Nordenkamp, R.C. Leegood and S.P. Long, eds), Chapman and Hall. pp 193 –206.
- Borecký, J. y Vercesi, A. E. 2005. Plant uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase: energy metabolism and stress. *Bioscience Reports*. 25(4): 271-286.
- Boyko, H. 1966. Salinity and Aridity. New Approaches to Old Problems. *Monographiae Biologicae* Vol. XVI. 408 pp.
- Breidenbach, R. W., Saxton, M. J., Hansen, L. D. y Criddle, R. S. 1997. Heat Generation and Dissipation in Plants: Can the Alternative Oxidative Phosphorylation Pathway Serve a Thermoregulatory Role in Plant Tissues Other Than Specialized Organs? *Plant Physiology*. 114. 1137-1140.
- Busch, A. y Hippler, M. 2011. The structure and function of eukaryotic photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1807 (8): 864 – 877.
- Carillo, P., Grazia, M. A., Pontecorvo, G., Fuggi, A., and Woodrow, P. 2011. Salinity stress and salt tolerance. En: Abiotic stress in plants – Mechanisms and adaptations. Shanker, A. (Ed). Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/abioticstress-in-plants-mechanisms-and-adaptations/salinity-stress-and-salt-tolerance>.
- Chaves, M. M., Flexas, J. y Pinheiro, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant cell. *Annals of botany*. 103: 551-560.

- Chen, S., Zhou, F., Yin, C., Strasser, R. J., Yang, C. y Qiang, S. 2011. Application of fast chlorophyll a fluorescence kinetics to probe action target of 3-acetyl-5-isopropyltetramic acid. *Environmental and Experimental Botany*. 71: 269-279.
- Chen, S. y Polle, A. 2010. Salinity tolerance of *Populus*. *Plant Biology*. 12. 317-333.
- Chow, W. S., Melis, A. y Anderson, J. A. 1990. Adjustemnts of photosystem stoichiometry in chloroplasts improve the quantum efficiency of photosynthesis. *PNAS*. 87: 7502 – 7506.
- Conn, S. y Guilliham, M. 2010. Comparative physiology of elemental distributions in plants. *Annals of Botany*. 105:1081 – 1102.
- Cuttriss, A. J., Mimica, A. J., Howitt, C. A. y Pogson, B. J. (2007) Carotenoids. En: The structure and function of plastids. Wise, R. R. y Hooper, J. K. Springer. Pp 315 – 334.
- D'Ambrosio, N., Guadagno, C. R. y Virzo de Santo, A. 2008. Is qE always the major component of non photochemical quenching? En: Photosynthesis. Energy from sun. 14th International Congress on Photosynthesis. Allen, J. F., Gantt, E., Golbeck, J. H. y Osmond, B. (Eds) Springer Netherlands. Pp 1001-1004.
- Dajic, Z. 2006. Salt stress. En: Madhava, R., Raghavendra, A. S. and Janardhan R. K. (eds.), Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants. Springer. Pág 60.
- Delosme, R. y Joliot, P. 2002. Period four oscillations in chlorophyll a fluorescence. *Photosynthesis Research*. 73:158-168.
- Directorate Plant Production. 2010. Mung bean. Production guideline. Department of Agriculture, Forestry and Fisheries. Republic of South Africa. Pp. 16.
- Enríquez, S, y Borowitzka, M. A. 2011. The use of the fluorescence signal in studies of seagrasses and macroalgae. En: Suggett, D. J., Prásil, O. y Borowitzka, M. A. (Eds) Chlorophyll a fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications. Springer Dordrecht Heidelberg, pp 187 - 208.
- Falqueto, A. R., Silva, F. S., Cassol, D., Magalhães, A. M., Oliveira, A. C. y Bacarin, M. A. 2010. Chlorophyll fluorescence in rice: probing of senescence driven changes of PSII activity on rice varieties differing in grain yield capacity. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 22: 35 – 41.
- Fan, D. Y., Hope, A. B., Smith, P. J., Jia, H., Pace, R. J., Anderson, J. M. y Chow, W. S. 2008. The Stoichiometry of Photosystem II to Photosystem I in Higher Plants. En: Photosynthesis. Energy from the sun: 14th International Congress on Photosynthesis. Allen, J. F., Gantt, E., Golbeck, J. H. y Osmond, B. (Eds.). Springer.

- FAO. 1999. Poverty alleviation and food security in Asia: land resource. On line: [www.fao.org](http://www.fao.org).
- Fernández, J. A., García, M. J. y Maldonado, J. M. 2008. Absorción y transporte de nutrientes minerales. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Azcón-Bieto, J. y Talón, M. Mc Graw Hill. Segunda edición. Madrid, España. Pp 123 – 141.
- Fernie, A. R., Carrari, F. y Sweetlove, L. J. 2004. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology*. 7:254-261.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G. y Sharkey, T. D. 2004. Diffusive and metabolic limitation to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology*. 6: 1-11.
- Flowers, T. J., Troke, P. F. y Yeo, A. R., 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*. 28: 89–121.
- Gaber M. Abogadallah, G. M. 2010. Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signaling and Behavior*. 5 (4): 369-374.
- Genty, B., Briantais, J. M. and Baker, M. R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*. 990: 87-92.
- González, S. M. y Peñalosa, I. C. 2000. *Biomoléculas. Métodos de análisis*. UNAM. 256 p.
- González, S. M., Perales, H. V., Salcedo, M. O. y Vaca, S. P. 2006. *Biología celular y bioquímica. Proyectos cortos, experimentos y métodos*. UNAM. 238 p.
- González, S. M., Perales, H. V. y Salcedo, M. O. 2008. La fluorescencia de la clorofila *a* como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*. 27 (4): 119-129.
- González-Moreno, S., Perales-Vela, H. y Salcedo, M. A. 2002. An experiment illustrating the effect of saline stress and ion son the malate dehydrogenase anctivity in vegetal tissues. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 30 (6): 384 – 389.
- Gorham, J., Wyn Jones, R. G. y McDonnell. 1985. Some mechanisms of salt tolerance in crop plants. *Plant and soil*. 89:15 – 40.
- Govindjee. 1995. Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll *a* fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology*. 22: 131-160.

- Govindjee, Kern, J. F., Messinger, J. y Whitmarsh, J. 2010. Photosystem II. En: Encyclopedia of Life Science. John Wiley and Sons, Ltd: Chichester.
- Gramer, G. R. 2004. Sodium-calcium interactions under salinity stress. En: Salinity: Environment – Plants – Molecules. Läuchli, A. y Lüttge, U. (Eds.) Kluwer Academic Publishers. NY. USA. pp.205-228.
- Grattan, S. R. y Grieve, C. M. 1999. Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia horticulturae*. 78: 127 – 157.
- Hall, J. D., Barr, R., Al-Abbas, A. H. y Crane, F. L. 1972. The ultrastructure of chloroplasts in mineral-deficient maize leaves. *Plant Physiology*. 50: 404 – 409.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station*. 347: 1-32.
- Hossain, M. M., Miah, M. N. A., Rahman, M. A., Islam, M. A. e Islam, M. T. 2008. Effect of salt stress on growth and yield attributes of mungbean. *Bangladesh Research Publication Journal*. (4): 324-336.
- Horie, T., Hauser, F. y Schroeder, J. I. 2009. HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in *Arabidopsis* and monocot crop plants. *Trends in Plant Science*. 14 (12): 660 – 668.
- Hurry, V. M. y Huner, N. P. 1992. Effect of Cold Hardening on Sensitivity of Winter and Spring Wheat Leaves to Short-Term Photoinhibition and Recovery of Photosynthesis. *Plant Physiology*. 100: 1283 – 1290.
- INEGI. 2012. Estadísticas a propósito del día mundial de lucha contra la desertificación y la sequía. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. En línea: [www.inegi.org.mx](http://www.inegi.org.mx).
- Jacoby, B. 1964. Function of bean roots and stems in sodium retention. *Plant Physiology*. 39 (3): 445-449.
- Jacoby, B. 1965. Sodium retention in excised vean stems. *Physiologia Plantarum*. 18: 730-739.
- Jacoby, B. 1999. Mechanisms involved in salt tolerance of plants. En: Handbook of Plant and Crop Stress. Pessaraki, M. (Ed.) Segunda Edición. Marcel Dekker, Inc. NY. 97-123 pp.
- Jacoby, R. P., Taylor, N. L., and Millar, A. H. 2011. The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance. *Trends in Plant Science*. 16 (11): 614-623.

- Kafkafi, U., Imas, P., Tarchitzky, J. 2001. Potassium and chloride in higher plants. In: Potassium and chloride in crops and soils: the role of potassium chloride fertilizer in crop nutrition. Johnston, A. E. (Ed). International Potash Institute. 220 pp.
- Kato, M. C., Hikosaka, K., Hirotsu, N., Makino, A. y Hirose, T. 2003. The excess light energy that is neither utilized in photosynthesis nor dissipated by photoprotective mechanisms determines the rate of photoinactivation in photosystem II. *Plant Cell Physiology*. 44 (3): 318 – 325.
- Kitajima, M. y Butler, W. L. 1975. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochimica et Biophysica Acta*. 376: 105 – 115.
- Kramer, D. M., Johnson, G., Kiirats, O., y Edwards, G. E. 2004. New fluorescence parameters for the determinations of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research*. 79: 209-218.
- Lahaye, P. A. y Epstein E. 1971. Calcium and salt toleration by vean plants. *Physiologia Plantarum*. 25: 213 – 218.
- Lastra, O. C. 2010. Sodio en plantas C4. C4 y CAM. En: González, J. R. and Chueca, A. S. Eds. Características generales y uso en programas de desarrollo de tierras áridas y semiáridas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Fundación Ramón Areces. Madrid España.
- Läuchli, A. 1984. Salt exclusion: an adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. En: Salinity tolerance in plants. Strategies for crop improvement. Staples, R. C. and Toenniessen, G. H. (Eds.). Wiley-Interscience. Canada.
- Li, G., Wan, S., Zhou, J., Yang, Z. y Qin, P. 2010. Leaf chlorophyll fluorescence, hyperspectral reflectance, pigments content, malondialdehyde and proline accumulation responses of castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings to salt stress levels. *Industrial Crops and Products*. 31: 13 – 19.
- Maas, E. V. y Poss, J. A. 1989. Salt sensitivity of cowpea at various growth stages. *Irrigation Science*. 10: 313-320.
- Manivannan, P., Abdul, C. A., Sankar, B., et al. 2007. Salt stress mitigation by calcium chloride in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Acta Biológica Cracoviensia*. 49 (2): 105-109.
- Marshall, R. H. 1988. Environmental factors affecting plant productivity. Fort Keogh Research Symposium, September 1987, Miles City, MT. 132 p.



- Maslenkova, L., Gambarova, N. y Zeinalov, Y. 1995. NaCl – induced changes in oxygen evolving activity and thylakoid membrane patterns of barley plants. Adaptation to salinity. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. 21:29 – 35.
- Maxwell, D. P., Wang, Y. y McIntosh, L. 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *PNAS*. 96. 8271-8276.
- McDonald, A. E. y Vanlerberghe, G. C. 2006. Origins, evolution history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part D 1: 357 – 364.
- Mehta, P., Allakhverdiev, I. S. y Jajoo, A. 2010. Characterization of photosystem II heterogeneity in response to high salt stress in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Photosynthesis research*. 105: 249 – 255.
- Misra, A. N., Murmu, B., Singh, P. y Misra, M. 1996. Growth and proline accumulation in mungbean seedling as affected by sodium chloride. *Biologia Plantarum*. 38 (4): 531-536.
- Møller, I. M. 2001. Plant Mitochondria and Oxidative Stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism os Reactive Oxygen Species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52: 561-591.
- Moore, A. L. y Whitehouse, D. G. 1997. Isolation and purification of functionally intact mitochondria and chloroplasts from plant cells. En: *Subcellular fractionation: A practical approach*. Graham, J. M. y Rickwood, D. (Eds.) Oxford University Press. N.Y. Pp. 265 – 266.
- Munns, R. 2011. En línea: [www.plantstress.com](http://www.plantstress.com).
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*. 25: 239-250.
- Munns, R. y Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. 59. 651-681.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y. y Allakhverdiev, S. I. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1767:414 – 421.
- Murillo-Amador, B., Enrique Troyo-Diéguéz, E., García-Hernández, J. L., López-Aguilar, R., Ávila-Serrano, N. Y., Zamora-Salgado, S., Rueda-Puente, E. O. y Kaya, C. 2006. Effect of NaCl salinity in the genotypic variation of cowpea (*Vigna unguiculata*) during early vegetative growth. *Scientia Horticulturae*. 108: 423-431.

- Nair, R. M., Yang, R. Y., Easdown, W. L., Thavarajah, D., Thavarajah, P., Hughes, J. A. y Keatinge, J. D. 2013. Biofortification of mungbean (*Vigna radiata*) as a whole food to enhance human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93 (8): 1805 – 1813.
- Nandwal, A. S., Godara, M., Sheokand, S., Kamboj, D. V., Kundu, B. S., Kuhad, M. S., Kumar, B. y Sharma, S. K. 2000. Salinity Induced Changes in Plant Water Status, Nodule Functioning and Ionic Distribution in Phenotypically Differing Genotypes of *Vigna radiata* L. *Journal of Plant Physiology*. 156: 350-359.
- Neumann, P. 1997. Salinity resistance and plant growth revisited. *Plant, Cell and Environment*. 20: 1193-1198.
- Orcutt, D. M. y Nilsen E. T. 2000. Salinity stress. En: Physiology of plants under stress. Soil and Biotic Factors. Jhon Wiley & Sons, Inc. NY. USA. pp 177-235.
- Osmond, C. B., Austin, M. P., Berry, J. A., Billings, W., Boyer, J., Dacey, J. W., Nobel, P., Smith, S. y Winner, W. 1987. Stress physiology and the distribution of plants. *Bioscience*. 37 (1) 38-47.
- Parida, A. K. y Das, A. B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60. 324-349.
- Perales, H. V. 2001. Efecto del estrés salino sobre los eventos primarios de la fotosíntesis en *Triticum aestivum* L. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. Estado de México.
- Pföndal, E. E., Klughammer, C., Meister, A. y Cerovic, Z. G. 2013. Deriving fluorometer-specific values of relative PSI fluorescence intensity from quenching of  $F_o$  fluorescence in leaves of *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays*. *Photosynthesis Research*. 114:189-206.
- Pribil, M., Labs, M. y Leister, D. 2014. Structure and dynamics of thylakoids in land plants. *Journal of Experimental Botany*. eru090: 1 – 18.
- Raghavendra, A. S. y Padmasree, K. 2003. Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *TRENDS in Plant Science*. 8 (11): 546-553.
- Rengasamy P. 2010. Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. *Functional Plant Biology*. 37, 613–620.
- Ribas-Carbó, M., Flores-Sarasa, I. y González-Meler, M. 2008. La respiración de las plantas. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcón-Bieto, J. y Talón, M. Mc Graw Hill. Segunda edición. Madrid, España. Pp 265 – 286.

- Roháček, K. 2002. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica*. 40: 13 – 29.
- Ruban, A. V. y Johnson, M. P. 2009. Dynamics of higher plant photosystem cross-section associated with state transitions. *Photosynthesis Research*. 99: 173 – 183.
- Rus, A., Yokoi, S., Sharkhuu, A., Reddy, M., Lee, B., Matsumoto, T. K., Koiwa, H., Zhu, J. K., Bressan, R. A. y Hasegawa, P. M. 2001. AtHKT is a salt tolerance determinant that controls Na<sup>+</sup> entry into plant roots. *PNAS*. 98 (24): 14150-14155.
- Saha, P., Chatterjee, P. y Biswas, A. K. 2010. NaCl pretreatment alleviates salt stress by enhancement of antioxidant defense system and osmolyte accumulation in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Indian Journal of Experimental Biology*. 48: 593 – 600.
- Saha, P., Kunda, P. y Biswas, A. K. 2012. Influence of sodium chloride on the regulation of Krebs cycle intermediates and enzymes of respiratory chain in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. 60: 214 – 222.
- Schansker, G., Tóth, S. Z., Holzwarth, A. R. y Garab, G. 2014. Chlorophyll a fluorescence: beyond the limits of the QA model. *Photosynthesis Research*. 120: 43 – 58.
- Schansker, G., Tóth, S. Z. y Strasser, R. J. 2005. Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1706: 250 – 261.
- Schansker, G., Tóth, S. Z. y Strasser, R. J. 2006. Dark recovery of the Chl a fluorescence transient (OJIP) after light adaptation: The qT component of non-photochemical quenching is related to an inactivated photosystem I acceptor side. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1757: 787 – 797.
- Segura, J. 2008. Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcón-Bieto, J. y Talón, M. Mc Graw Hill. Segunda edición. Madrid, España. Pp 351 – 376.
- Sehrawat, N., Jaiwal, P. K., Yadav, M., Bhat, K. V. y Sairam R. K. 2013. Salinity stress restraining mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) production: Gateway for genetic improvement. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 6 (9): 505 – 509.
- SEMARNAT. 2012. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México: compendio de estadísticas ambientales indicadoras clave y de desempeño ambiental. SEMARNAT. México. En línea: [http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe\\_12/index.html](http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_12/index.html).

- Shannon, M. C. 1997. Adaptation of plants to salinity. *Advances in Agronomy*. 60:75-120.
- Shavrukov, Y. 2013. Salt stress or salt shock: wich genes are we studying? *Journal of Experimental Botany*. 64: 119 – 127.
- Singh, R. P., Tripathi, R. D., Dabas, S., Rzbi, S. M. H., Ali, M. B., Sinha, S. K., Gupta, D. K., Mishra, S. y Rai, U. N. 2003. Effect of lead on growth and nitrate assimilation of *Vigna radiata* (L.) Wilczek seedlings in a salt affected environment. *Chemosphere*. 52:1245 – 1250.
- Strasser, B. J. 1997. Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. *Photosynthesis Research*. 52: 147 – 155.
- Strasser, B. J. y Strasser, R. J. 1995. Mesasuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. En: *Photosynthesis: from light to biosphere*. Mathis P. (Eds) Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. pp. 977-980.
- Strasser, R. J. 1981. The grouping model of plant photosynthesis: heterogeneity photosynthetic units in thylakoids. En: Akoyunoglou G (ed) *Photosynthesis III. Structure and Molecular organization of the photosynthetic apparatus*. Pp. 727-737. Balaban International Science Services, Philadelphia, Pa.
- Strasser, R. J., Srivastava, A. y Tsimilli-Michael, M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. En: *Probing Photosynthesis, Mechanism, Regulation, Adaptation*. Editores: Yunus M, Pathre U, Mohanty P. Taylor y Francis. New York. Pp 445-483.
- Strasser, R. J. y Stirbet, A. D. 2001. Estimation of the energetic connectivity of PS II centres in plants using the fluorescence rise O–J–I–P: Fitting of experimental data to three different PS II models. *Mathematics and Computers in Simulation*. 56: 451-461.
- Sweetlove., L. J., Heazlewood, J. L., Herald, V., Holtzapffel, R., Day, D. A., Leaver, C. J. y Millar, A. H. 2002. The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria. *The Plant Journal*. 32: 891-904.
- Szabados, L. y Saviouré, A. 2009. Proline a multifunctional aminoacid. *Trends in Plant Science*. 15 (2): 89 – 97.
- Taiz, L., y Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*. 5th Ed. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA.

- Takahashi, S. y Murata, N. 2008. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science*. 13 (4): 178 – 182.
- Tanaka, R., y Tanaka, A. 2011. Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochimica et biophysica Acta*. 1807: 968 – 976.
- Tavakkoli, E., Fateshi, F., Coventry, S., Rengasamy, P. y McDonald, G. K. 2011 Additive effects of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions on barley growth under salt stress. *Journal of Experimental Botany*. 62 (6): 2189-2203.
- Teakle, N. and Tyerman, S. D. 2010. Mechanisms of Cl<sup>-</sup> transport contributing to salt tolerance. *Plant, Cell and Environment*. 33. 566–589.
- Tóth, S. Z. 2006. Analysis and application of the fast Chl a fluorescence (OJIP) transient complemented with simultaneous 820 nm transmission measurements. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad de Génova. Génova.
- Türkan, I. and Demiral, T. 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 67. 2-9.
- US Salinity Laboratory. 1969. Diagnosis and improvement of saline and alkaline soils. Agriculture Handbook No. 60. Department of Agriculture, USA.
- Vanlerberghe, G. C. y McIntosh, L. 1997. Alternative oxidase: from gene to function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48: 703-734.
- Vass, I. 2012. Molecular mechanisms of photodamage in the photosystem II complex. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1817: 209 – 217.
- Wakeel, A., Farooq, M., Qadir, M. y Schubert, S. 2011. Potassium substitution by sodium in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 30: 401-413.
- Wang, S., Zheng, W., Ren, J., y Zhang, C. 2002. Selectivity of various types of salt-resistant plants for K<sup>+</sup> over Na<sup>+</sup>. *Journal of Arid Environments*. 52:457-472.
- Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers. *Journal of Plant Physiology*. 144. 307 – 313.

Wilhelm, C. y Selmar, D. 2011. Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: The physiological limits of improved photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*. 168: 79 – 87.

Yeo, A. R. 1983. Salinity resistance: Physiologies and prices. *Physiologia Plantarum*. 58:214 – 222.

Yusuf, M. A., Kumar, D., Rajwanshi, R., Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., Govindjee y Sarin, N. B. 2010. Overexpression of  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll *a* fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1797: 1428 – 1438.

Zaghdoudi, M., Msilini, N., Govindachary, S., Lachaal, M., Ouerghi, Z. and Carpentier, R. 2011. Inhibition of photosystems I and II activities in salt stress-exposed Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 105: 14–20.

Zhu, J. K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*. 6 (2): 66-71.

Zsigmond, L., Szepesi, A., Tari, I., Rigó, G., Király, A. y Szabados, L. 2012. Overexpression of the mitochondrial *PPR40* gene improves salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Science*. 182: 87 – 93.

## Apéndice

### Solución nutritiva Hoagland

La preparación de 20 litros de solución nutritiva Hoagland consiste en pesar las cantidades indicadas en la siguiente lista y aforar con agua destilada.

#### Solución Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950)

Compuesto	Cantidad
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.72 g
$\text{KNO}_3$	10.1 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	16.4 g
$\text{MgSO}_4$	4.8 g
EDTA-Fe (5 g/l)	20 ml
Micronutrientes*	20 ml

\*Para preparar la solución de Micronutrientes se pesan las cantidades indicadas y se afora a un litro de agua destilada:

Micronutrientes	Cantidad
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2.86 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.08 g
$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.02 g