

00361
34
2eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“Mecanismos de resistencia del frijol mungo
(*Vigna radiata*) a la salinidad”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(B I O L O G I A)
P R E S E N T A :

ROBERTO VELASCO GARCIA

DIRECTOR DE TESIS: M.EN C. SERGIO GONZALEZ MORENO

MEXICO, D. F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

DEDICATORIA

A LA MEMORIA DE MI PADRE

A MI MADRE

A ROCÍO

A MIS HERMANOS

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ
EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA DE
LA UNIDAD DE MORFOFISIOLOGÍA DE LA
E. N. E. P. IZTACALA, BAJO LA DI-
RECCIÓN DEL M. en C. SERGIO GONZÁ-
LEZ MORENO.

INDICE

	PAGINA
Abreviaturas	i
Resumen	ii
I.- Introducción	1
II.- Objetivos	17
III.- Material y Métodos	19
III.1 Pruebas de germinación	19
III.2 Cultivo de plántulas	20
III.3 Determinación de biomasa	21
III.4 Cuantificación de iones	21
III.5 Cuantificación de prolina	21
III.6 Patrones protéicos	22
III.7 Semipurificación y caracterización parcial de P40.	23
III.8 Aislamiento de vacuolas	24
III.9 Tratamiento estadístico	26
IV.- Resultados y discusión	27
IV.1 Germinación y crecimiento de plántulas bajo condiciones salinas.	27
IV.2 Niveles de sodio.	33
IV.3 Niveles de potasio, calcio y magnesio.	37
IV.4 Niveles de prolina.	48
IV.5 Patrones protéicos.	51
IV.6 Semipurificación y caracterización parcial de P40.	63
IV.7 Aislamiento de vacuolas.	70
V.- Conclusiones	77
Referencias	79

ABREVIATURAS

AAB	-Acido abscísico
CHAPS	-(3-[(colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato)
MES	-Acido (2[N-morfolino]etanosulfónico)
PMSF	-Fenilmetilsulfonil fluoruro
RNAm	-Acido ribonucléico mensajero
SDS	-Dodecil sulfato de sodio
%T	-Concentración del gel de poliacrilamida, definida como el porcentaje total de monómeros. (acrilamida+bisacrilamida g/100 ml)
TCA	-Acido tricloroacético
TRIS	-(Tris[hidroximetil]aminometano)

RESUMEN

Con la finalidad de tener un conocimiento más amplio de los mecanismos que permiten a los vegetales desarrollarse en un ambiente salino, en el presente trabajo se utilizó como modelo de estudio al frijol mungo (*Vigna radiata*) sometién dosele a un estrés con NaCl en condiciones hidropónicas. Se evaluó el grado de resistencia de esta planta durante sus etapas de germinación y plántula; se determinaron los niveles de Na^+ , K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} , y del aminoácido prolina, en raíz, tallo y hoja de plántulas crecidas en distinta concentración de la sal (0-150 mM); se obtuvieron los patrones protéicos de estos mismos tejidos de plantas control y salinizadas (100 mM de NaCl). Finalmente, y en consideración de la importancia que parecen tener las vacuolas en la adaptación de los vegetales al estrés salino, se buscó una metodología que permitiera aislar dichos organelos de la raíz del vegetal en cuestión.

Los resultados obtenidos muestran que el frijol mungo resiste concentraciones relativamente altas de la sal durante las etapas de germinación y plántula (150 y 100 mM, respectivamente). Bajo condiciones de salinidad el vegetal tolera una alta cantidad de Na^+ en sus tejidos (hasta 2000 $\mu\text{moles/g}$ de peso seco), y al mismo tiempo presenta variaciones en los niveles de K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} ; los cambios en los dos primeros iones (Na^+ y K^+) parecen relacionarse con procesos de osmorregulación, mientras que los del Mg^{++} podrían estar involucrados en la excreción del Na^+ y/o su compartimentalización vacuolar en raíz.

En lo referente a la prolina, ésta se incrementó en las distintas partes de las plantas sometidas a estrés, no obstante, este aumento no es tan grande como para poder decir que el aminoácido puede, por sí solo, mantener un equilibrio osmótico en el interior de la planta que ha sido estresada.

La presencia de sal (100 mM), en el medio de crecimiento, causó un incremento en la concentración de tres proteínas foliares y una radicular, siendo el cambio en esta última más evidente que el de las primeras. La proteína de raíz tiene un peso aproximado de 40 kD (P40), y su aumento es más claro en plantas que fueron salinizadas durante 5 días, desde el momento de la germinación; la presencia de ácido abscísico (AAB) 10 μM , en la solución nutritiva, provocó también un incremento en P40, aunque no al grado del que produce la sal; en forma contraria, la adición de CaCl_2 10 mM al medio con NaCl 100 mM redujo la respuesta causada por esta última. P40 forma parte de una proteína oligomérica que puede ser purificada utilizando una metodología que aquí se describe.

Para el aislamiento de vacuolas se utilizó una metodología que involucra la obtención de protoplastos por digestión enzimática, la lisis de estos por choque osmótico en presencia del detergente CHAPS y la purificación de vacuolas en un gradiente de sacarosa/manitol. El rendimiento de los organelos obtenidos por este método es bajo, sin embargo, parece ser un buen principio para el aislamiento de vacuolas de raíces típicas, como las de frijol mungo, de lo cual hasta el momento no parece existir información.

I- INTRODUCCION

El crecimiento desmesurado de la población humana demanda una mayor producción de alimentos, sin embargo, las áreas destinadas al cultivo de especies vegetales comestibles se están agotando. Una posible solución a este problema radica en la utilización de tierras que hasta la fecha no se han podido cultivar debido a las condiciones adversas que poseen.

Se sabe que de los 14,500 millones de ha de tierra que existen en el planeta, sólo 1,400 (alrededor del 10%) están clasificadas como tierras con condiciones favorables para el cultivo. El resto tienen productividad limitada o nula a causa de la falta o exceso de minerales, por sequía o inundación, por la poca profundidad y por el congelamiento permanente (Christiansen y Lewis 1987).

Dentro de los suelos con exceso de minerales destacan los salinos, cuya principal característica es la presencia de altas concentraciones de sales solubles (conductividad eléctrica > 4 mmhos/cm a 25°C), principalmente sulfato magnésico, cloruro sódico, sulfato sódico, carbonato sódico y cloruro magnésico.

Los suelos salinos existen en diversas partes del mundo, reduciendo la productividad de considerables áreas de tierra. Se ha estimado que aproximadamente 4×10^8 de las 1.5×10^9 ha de tierra que se cultivan en todo el mundo tienen suficiente cantidad de sales para reducir el potencial agronómico de éstas. La estimación anterior excluye las regiones clasificadas como áridas. Junto con estos tipos de suelos, es muy posible que las tierras afectadas por

elevados niveles de sales excedan las 1.5×10^9 ha o lleguen aproximadamente al 40% de las 4×10^9 ha de tierra potencialmente arables (Rains 1979).

Refiriéndonos específicamente a la República Mexicana, se sabe que de los 200 millones de ha que posee, 170 (85%) están ocupadas por montañas y desiertos, reduciéndose la superficie cultivable a los 30 millones de ha restantes (15%). Se ha calculado que el 10% de esta área (3 millones de ha) es afectada por la salinidad (Cortes 1985), abarcando del 20 al 30% de la superficie de 5.5 millones de ha que ocupan los distritos de riego (Fernández 1990), particularmente en las zonas norte y noroeste del país (Cajuste 1977). Así, los suelos salinos ocupan casi todo el altiplano, desde Chihuahua y Coahuila, hasta Jalisco, Michoacán, Valle de México, Puebla, Tlaxcala y parte de la línea costera en el norte del país (Ramos 1979). Los terrenos del ex-Lago de Texcoco, que ocupan 26,700 ha cerca de la ciudad de México, son probablemente una de las áreas del mundo en donde las concentraciones de sales solubles y de sodio intercambiable son las más elevadas, siendo la conductividad eléctrica de la solución de estos suelos del orden de 160 a 300 mmhos/cm, y el porcentaje de sodio intercambiable mayor a 90 en ciertas partes de esta área (Fernández *op. cit.*); los cultivos resistentes a la salinidad toleran conductividades de 16 a 32 mmhos/cm (Cajuste *op. cit.*).

El problema de la salinización de tierras no es estático, ya que puede verse incrementado cuando el influjo de sales es mayor que el eflujo. Algunas de las causas de este desbalance pueden ser

las siguientes (Tamhane 1983):

— Cuando un riego excesivo eleva el nivel del agua subterránea, provocando la concentración de sales del agua freática salina a través de la evaporación.

— Cuando el agua de riego aplicada tiene un alto contenido de sales. Se ha estimado que entre el 50 y el 60% de los suelos salinos son consecuencia de este factor.

— Cuando un mal desagüe conserva las sales en el suelo superficial e impide la lixiviación de estos compuestos.

— Cuando el empleo de agua de riego es irregular, es decir, cuando se producen inundaciones repentinas seguidas de sequía intensa.

La problemática que los suelos salinos plantean para los cultivos puede ser abordada, para su solución, a través de dos estrategias (Christiansen y Lewis 1987), las cuales no son mutuamente excluyentes. La primera de ellas consiste en la modificación del ambiente salino, que podría darse a través del riego, la utilización de sustancias que aceleren el movimiento de las sales y por medio del mejoramiento del drenaje. Sin embargo, en muchos lugares los recursos hidráulicos se están agotando rápidamente, y desde el punto de vista económico, el restablecimiento de zonas de riego así como la realización de los otros puntos es prácticamente imposible.

Una estrategia alternativa para hacer frente a los problemas de salinidad consiste en seleccionar y manipular el material genético de las plantas (ver esquema 1). Las especies halófilas¹

¹La resistencia a la salinidad varía entre las especies, lo que ha llevado a la formación de dos categorías de vegetales: las GLICOFITAS, que soportan solo bajas concentraciones de sales, y las HALOFILAS, que resisten concentraciones relativamente altas.

silvestres pueden ser usadas en forma directa utilizando el agua de mar para cultivarlas. Sus semillas pueden servir como alimento y la materia vegetativa como pastura, fibra y combustible (Epstein 1979). Los indios Seri, en Sonora, usan semillas de *Zostera marina* para su alimentación (Felger y Moser 1973). Esta especie corresponde a uno de los pocos grupos de plantas con flor que crecen sumergidas completamente en agua de mar; no se tiene conocimiento acerca de si esta planta ya se ha tratado de cultivar. Los usos potenciales de otras especies ya se han abordado ampliamente en un trabajo previo (Somers 1979).

Por otro lado, las plantas silvestres resistentes a la salinidad pero sin valor económico o nutricional, pueden ser usadas como fuente de germoplasma para transferir esta tolerancia a especies sensibles pero de importancia económica (inciso b del esquema 1). Investigadores de la Universidad de California colectaron un tomate silvestre, *Lycopersicon cheesmanii*, en sitios cercanos a las islas Galápagos. Este fue capaz de sobrevivir en una salinidad equivalente a la del agua de mar. Si bien el fruto de la especie silvestre es demasiado pequeño para su uso comercial, la progenie F2 de cruza de esta especie con las comerciales, incluye segregantes con un fruto de tamaño aceptable y con tolerancia a una salinidad equivalente a un tercio de la del agua de mar (Rush y Epstein 1976).

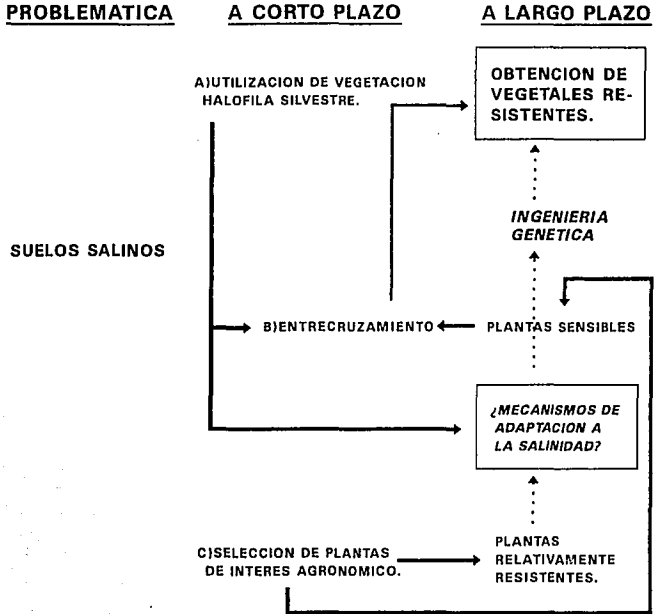
A pesar de que las plantas cultivadas por el hombre tienen una tendencia general de sensibilidad a la sal, se ha visto que existen

algunos vegetales que escapan a la regla (inciso c, esquema 1). Se han seleccionado genotipos de arroz (Christiansen, 1987), cebada y trigo (Epstein, 1979), por su resistencia a la salinidad; en estas dos últimas, hasta en una concentración equivalente al 75 y 50% de la del agua de mar.

Los tres puntos antes mencionados han sido utilizados ampliamente para tratar de combatir la problemática de los suelos salinos. No obstante, se considera que la ingeniería genética (también llamada tecnología del DNA recombinante o clonación genética) es, en potencia, una herramienta más eficaz para estos fines. De hecho, existen investigaciones en donde ciertos genes han sido utilizados para conferir a algunas plantas una multitud de características deseables, como son: estatura corta, niveles superiores de aminoácidos y resistencia a enfermedades, entre otras (Epstein, 1976).

Con respecto a la resistencia a la salinidad, se han realizado estudios interesantes con los microorganismos *Salmonella*, *Klebsiella* y *Escherichia coli*, (Le Rudulier y Valentine, 1982). Estas bacterias son incapaces de crecer y multiplicarse en un medio conteniendo NaCl al 0.8 M; sin embargo, en un medio suplementado con glicinbetaína (betaina) o prolina al 0.5 mM, la duplicación se ve estimulada, atribuyéndoseles a estos dos metabolitos un papel de osmorreguladores. Los mismos autores mencionan que el gen ProBA, responsable de la sobreproducción de prolina en una cepa de *Salmonella* osmotolerante, puede ser introducido por clonación a bacterias de una cepa de *E. coli* osmosensible, confiriéndoseles

SOLUCION POTENCIAL



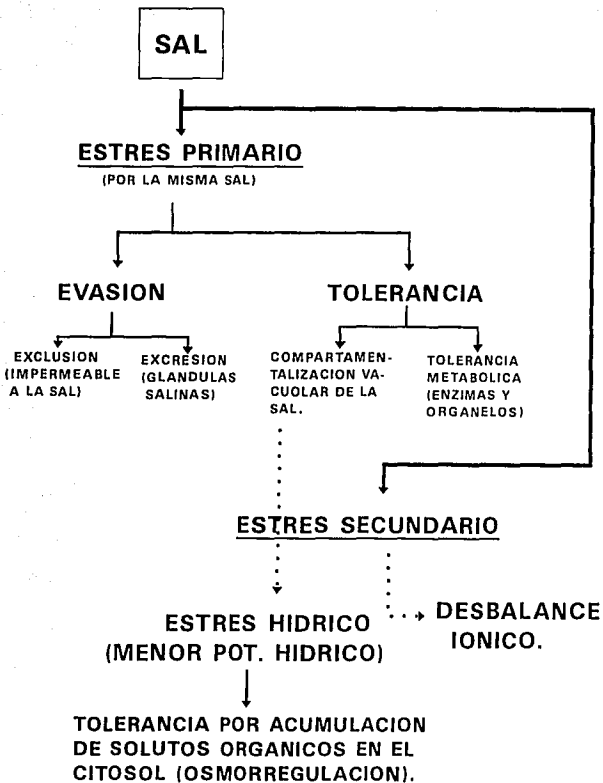
ESQUEMA 1.- Soluciones potenciales a la problemática de los suelos salinos (seleccionando y manipulando el material genético vegetal).

a estas últimas la característica de osmotolerancia.

En teoría, esta "transferencia" de resistencia a la salinidad se podría realizar también en otros vegetales; no obstante, aquí surge necesariamente una pregunta ¿que característica(s) permite(n) a las plantas ser resistentes a la salinidad?. Tratando de dar solución a esta interrogante, se han realizado diversos estudios (ver Levitt, 1980 y Staples y Toenniessen, 1984), y las conclusiones principales que se han obtenido de ellos se resumen en el esquema 2 de este trabajo.

Antes que nada debemos de considerar que la sal puede tener efectos dañinos por sí misma (estrés primario), y otros derivados por los desbalances iónicos y osmóticos que causa (estrés secundario); sin embargo, aunque las plantas resistentes parecen presentar mecanismos de defensa para contrarrestar ambos tipos de estrés, estas estrategias parecen diferir de especie a especie. Así por ejemplo, mientras ciertos vegetales "toleran" la presencia en sus tejidos, otras las "evaden". Aún más, dentro de este último grupo de plantas "evasivas" existen aquellas cuyas raíces son poco permeables a las sales (Levitt *op. cit.*), y las que permiten su entrada pero las excretan activamente (por ejemplo vía glándulas salinas en mangles) (Thomson *et al.*, 1988).

Refiriéndonos a la tolerancia a la salinidad (ver esquema 2) se ha sugerido que pueden existir al menos dos mecanismos: a) Tolerancia metabólica (enzimas y organelos resistentes) y b) Compartimentalización vacuolar de la sal.



ESQUEMA 2.- Mecanismos propuestos para explicar la resistencia de las plantas a la salinidad (modificación de Levitt 1980).

La primera de estas teorías parece tener poco apoyo experimental, ya que la mayoría de los estudios realizados *in vitro* con enzimas extraídas de halófilas y glicófitas, demuestran que éstas son igualmente sensibles a la presencia de sal en el medio de reacción (Greenway y Osmond, 1972, Flowers et al., 1976 y Greenway y Munns, 1980). En forma contraria, la teoría de la compartimentalización vacuolar es más aceptada, esto debido al gran número de trabajos que la respaldan (ver Flowers et al., 1977 y Match et al., 1987).

Los iones que entran al citosol (Na^+ y Cl^- por ejemplo), son subsecuentemente secuestrados en las vacuolas, evitando así la interacción entre la maquinaria metabólica y estos. Resultados obtenidos en varios laboratorios han mostrado que el tonoplasto (membrana vacuolar) posee, de manera abundante, 2 enzimas: una ATPasa y una pirofosfatasa; estas dos moléculas se encargan de transportar H^+ al interior de la vacuola (Sze, 1985), generando así un gradiente de pH (ΔpH) y un potencial de membrana ($\Delta \Psi$) a través del tonoplasto; juntos, estos dos factores constituyen la fuerza protomotriz (FPM), cuyo potencial energético se utiliza para realizar diversos procesos de transporte a través de la membrana vacuolar. Dos de los sistemas que realizan estos procesos son los transportadores Na^+/H^+ y Ca^+/H^+ , que acoplan el flujo de los dos cationes metálicos, al flujo, en dirección opuesta, de los protones. En la figura de la siguiente página se presentan esquemáticamente los sistemas de transporte antes mencionados.

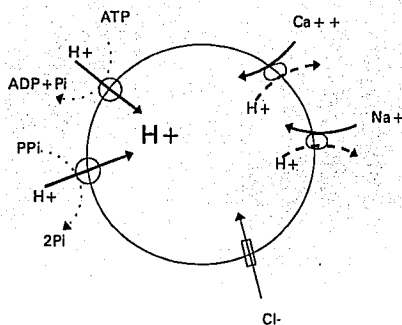


FIGURA 1.-Representación esquemática del transporte iónico en vacuolas (tomado de Blumwald, 1987).

Diversas investigaciones han mostrado que la actividad de estas enzimas se ve afectada por la presencia de NaCl. Por ejemplo, se ha visto que la adaptación de células de tabaco a la sal lleva a un incremento en el transporte de H^+ y en la actividad hidrolítica de ATP, por parte de la H^+ -ATPasa de tonoplasto (Reuveni et al., 1990). Asimismo, por medio de métodos citoquímicos, se ha evidenciado un incremento en la actividad de esta última enzima en raíz de tomate, cuando se agrega NaCl al medio de crecimiento (Sánchez-Aguayo et al., 1991). En forma contraria, la actividad de ATPasa de tonoplasto de dos especies de *Plantago* que difieren en su sensibilidad a la sal, no presenta diferencias interespecíficas ni se ve alterada cuando las plantas se exponen a NaCl 50 mM; no obstante, la actividad del antiport Na^+/H^+ solo se presentó en la especie resistente,

habiéndosele expuesto previamente al NaCl (Staal et al., 1991). De la misma forma, en raíz de cebada, el NaCl en el medio de crecimiento induce la actividad del antiport Na^+/H^+ del tonoplasto (Garbarino y Dupont, 1988). Estos últimos investigadores señalan que los cambios que encuentran se deben a que, bajo estas condiciones se sintetiza, posiblemente, una proteína integral de la membrana vacuolar. Una idea similar había sido anteriormente propuesta en un estudio en el que se utilizó microscopía electrónica en el alga roja *Porphyridium* (Knoth y Wiencke, 1984), y en el que se encontró un incremento en el número de partículas membranales del tonoplasto durante la adaptación de dicha alga a la salinidad; ellos señalan que estas partículas son proteínas de transporte cuya función es "combatir" la carga salina del citosol.

Probablemente la compartimentalización vacuolar de los iones, como el Na^+ , no es el único mecanismo que podría estar implicado en la disminución de la toxicidad iónica a nivel del citosol. Se ha propuesto que en *Hordeum vulgare* también se da un eflujo iónico a través del plasmalema (Jeschke, 1984 y Pitman et al., 1981). La energía necesaria para que se realice este proceso es aportada, aparentemente, al igual que en la vacuola, por el gradiente protónico generado por una H^+ -ATPasa, pero en este caso específica del plasmalema.

Ahora bien, si consideramos que la teoría de la compartimentalización vacuolar es correcta, estaremos también aceptando que este proceso puede llevar a un desbalance osmótico (y por lo tanto hídrico) entre la vacuola y el citosol (estrés

secundario en el esquema 2). Se ha propuesto que para compensar este desbalance las plantas pueden aumentar los niveles citoplásmicos de algunas moléculas no tóxicas, como pueden ser la betaína (Storey y Wyn Jones, 1977 y Shu Mei et al., 1981) y/o el aminoácido prolina (Huang y Cavalieri, 1979, Binzel et al., 1987 y Chandler y Thorpe, 1987), que como ya se mencionó en párrafos anteriores también parecen funcionar como osmorreguladores en bacterias.

Resulta interesante mencionar un trabajo (Pollard y Wyn Jones, 1979), en donde se demostró que la glicinbetaína aplicada hasta 500 mM en el medio de ensayo de diversas enzimas de vegetales y animales, no alteraba la actividad de éstas, mientras que el NaCl en la misma concentración las inhibía hasta en un 90%. En este mismo estudio se encontró que la glicinbetaína "protegia" a la malato deshidrogenasa de cebada de la inhibición que el NaCl (0.3M) causaba en ella. Estos resultados permiten suponer que la betaína puede, además de funcionar como un osmótico citosólico, "proteger" a las enzimas de los efectos tóxicos que sobre ellas tienen los iones.

Existen otras investigaciones que señalan que los dos compuestos antes mencionados no son los únicos que pueden estar involucrados en la osmorregulación, ya que los niveles de algunos azúcares también se ven incrementados durante la adaptación a la salinidad (Briens et al., 1982). Aún más, el K^+ también podría estar relacionado con el mantenimiento de la turgencia celular, pues se ha dicho que su concentración en los vegetales es superior a la que se necesita para que actúe como activador enzimático (Jensen, 1982). Este hecho, junto con la propuesta de que durante un estrés salino la planta puede

compartimentalizar el Na^+ en la vacuola, al mismo tiempo que el K^+ es excluido de ésta hacia el citosol (Jeschke y Nassery, 1981), es lo que ha llevado a suponer que dicho ion podría actuar como un osmótico; no obstante, para poder asegurar que las plantas tolerantes a la salinidad involucran este intercambio iónico, es necesario realizar estudios que nos permitan conocer las concentraciones reales en que estos dos iones se encuentran en su citosol y vacuola.

Por otro lado, desde 1984 a la fecha se han realizado varios estudios que sugieren que una proteína llamada osmotina guarda relación con la adaptación de las plantas a la salinidad. Dicha molécula, que ha recibido este nombre por la correlación positiva que existe entre su acumulación y el potencial osmótico celular, tiene un peso molecular de 26 kD y aparece en células de *Nicotiana tabacum* adaptadas, en cultivo, a 175 mM de NaCl (Ericson y Alfinito, 1984) y a 435 mM de NaCl y KCl (King et al., 1986 y Singh et al., 1987). Plantas de *Hordeum vulgare* (Hurkman y Takana, 1987) y *Lycopersicon esculentum* (King et al., 1986) creciendo con NaCl 200 y 170 mM, respectivamente, también presentan un aumento en esta proteína; en esta última especie el incremento es mayor en la raíz, con respecto al tallo y a las hojas.

La osmotina está presente en mayor cantidad en ciertas inclusiones vacuolares electrodensas, y en menor grado en el citosol; se encuentra en dos formas: una soluble en agua y otra en detergente, y puede alcanzar una concentración de hasta el 12% con respecto al total de proteína en células de *Nicotiana tabacum* adaptadas a la salinidad (Singh et al., 1987)

Algunos investigadores han sugerido (Bray 1988 y Singh et al., 1989) que el ácido abscísico (AAB), hormona vegetal que se sabe acelera la velocidad de adaptación de las células al NaCl, y que induce la síntesis de una proteína de 26 kD (Singh, 1987a), podría involucrarse también en la inducción o estabilización del RNAm de osmotina. Por su parte, el bajo potencial hídrico, presente durante el estrés salino, podría llevar a una traducción preferencial de dicho RNAm, o a una reducción en el recambio de osmotina.

La relación estrés salino, AAB y síntesis de algunas proteínas, es apoyada por experimentos realizados en hojas de *Lycopersicon esculentum*, en donde el estrés hídrico disparó la biosíntesis de AAB, resultando en una acumulación de la hormona (Bray op. cit.). De manera interesante, en un estudio el estrés osmótico llevó a una mayor síntesis de AAB en la raíz de *Xanthium strumarium* y *Lycopersicon esculentum* (Cornish, 1985). A este respecto, Ludewig (1988) ha demostrado que el AAB controla el estado hídrico de la planta, regulando no sólo la transpiración estomática, sino también la conductividad hídrica de la raíz.

No obstante la existencia de todos estos estudios, hasta el momento no se conoce el verdadero papel que juega la osmotina en la adaptación de las plantas a la salinidad, y mientras que en unos vegetales se sugiere que los incrementos en ella están relacionados con dicho proceso, en otros se le atribuye el papel de osmótico al K^+ , a la prolina y/o a la betaína; sin embargo, a pesar de esta diversidad de cambios que se plantean, se puede decir que a todos ellos se les involucra con el mantenimiento de un equilibrio osmótico

entre el citosol y la vacuola, durante la entrada masiva de iones tóxicos a ésta.

Aparte de la disminución en el potencial hídrico, que en algunas plantas lleva al proceso de osmorregulación antes discutido, la presencia de sal en el medio de crecimiento puede provocar también otro estrés secundario: un desbalance iónico (esquema 2), que la mayoría de las veces resulta en un desbalance nutricional de la planta. Así por ejemplo, existe la evidencia de que en glicófitas la salinidad inhibe la captación y transporte de nutrientes minerales como el N, P, K^+ y Ca^+ (Lynch et al., 1987). De estos efectos, posiblemente el más conocido sea la disminución que causa el NaCl sobre los niveles intracelulares de K^+ , el cual hemos dicho parece jugar un papel importante en el proceso de osmorregulación. A este respecto, se ha visto que las raíces de frijol mungo de dos días de desarrollo expuestas al NaCl, hasta 150 mM y durante 24 h, presentaron un decremento en la concentración intracelular de K^+ (Nakamura et al., 1990). Estos mismos autores reportan una disminución en la elongación radicular bajo condiciones salinas. El decremento en la concentración de K^+ parece estar relacionado con un desplazamiento del Ca^+ asociado a la membrana, fenómeno que es provocado a su vez por las altas concentraciones de Na^+ externo (Lynch op. cit. y Cramer et al., 1986).

Como lo demuestra la información vertida hasta aquí, a pesar de haberse realizado un gran número de investigaciones enfocadas a esclarecer los mecanismos que permiten a las plantas resistir el estrés salino, hasta el momento no se tiene un cuadro claro de ellos;

la información parece ser todavía más confusa en lo que respecta a los procesos que se llevan a cabo en los vegetales que son capaces de tolerar una alta concentración de sales en su interior. Posiblemente esta confusión se deba a que la diversidad vegetal ha llevado a una diversidad de respuestas hacia las condiciones estresantes, por lo que tal vez sea erróneo esperar procesos de adaptación comunes para la mayoría de los vegetales. No obstante, es necesario realizar un mayor número de estudios que arrojen luz sobre la incógnita que nos atañe. Considerando esto, y teniendo como marco de referencia lo escrito en páginas anteriores, el presente trabajo tuvo como objetivo general el tratar de conocer el o los mecanismos que le permiten al frijol mungo (*Vigna radiata*) desarrollarse, durante el estadio de plántula, bajo un estrés salino. Esta planta es una leguminosa importante en diversas áreas agrícolas tropicales y subtropicales del mundo; esto debido a que su semilla, rica en proteínas, es consumida por el humano en diversas formas. Fue seleccionada para este trabajo después de que, realizados algunos experimentos piloto, se demostró que tiene una relativa resistencia a la sal (NaCl). De hecho, en ese momento existía un antecedente que la catalogaba como "muy sensible" en sus etapas de germinación y plántula (Ashraf y Rasul, 1988), mientras que otro la mencionaba como "una leguminosa con resistencia intermedia" (NaCl hasta 150 mM) durante las mismas fases de desarrollo antes mencionadas (Imamul y Larher, 1983). A partir de esto se planteó el proyecto, cuyos objetivos particulares fueron los siguientes:

II. - OBJETIVOS

1.- Valorar el grado de resistencia que posee el frijol mungo hacia el estrés salino (NaCl), durante sus etapas de germinación y plántula.

2.- Determinar si esta planta evade o tolera las altas concentraciones del ion sodio en sus tejidos (raíz, tallo y hoja).

3.- Evaluar si la presencia de la sal en el medio de crecimiento provoca un desbalance iónico (K^+ , Ca^{++} y Mg^{++}) en estos mismos órganos.

4.- Determinar los niveles del aminoácido prolina en raíz, tallo y hoja de plántulas creciendo en medio salino y no salino.

5.- Obtener los perfiles protéicos (patrones electroforéticos de proteínas) de los distintos tejidos de plantas control y salinizadas.

6.- Semipurificar y caracterizar parcialmente una proteína que se sobreproduce en la raíz de plántulas sometidas al estrés salino.

7.- Estandarizar una metodología que permita aislar vacuolas de raíz de plántulas de frijol mungo, con el propósito de:

a) Conocer si la proteína que se sobreexpresa en raíz, bajo condiciones salinas, pertenece a este organelo.

b) Determinar la actividad de la H^+ -ATPasa del tonoplasto de raíces de plantas control y salinizadas; como ya se mencionó, esta enzima parece ser clave en el transporte iónico a nivel vacuolar.

La metodología que se siguió para cumplir estos objetivos es la que se describe en la siguiente sección.

III.- MATERIAL Y METODOS

Las semillas de frijol mungo (*Vigna radiata*) utilizadas en este trabajo se obtuvieron comercialmente; en todos los experimentos que se realizaron, las semillas se desinfectaron exponiéndolas durante 25 min a hipoclorito de sodio comercial sin diluir y enjuagándolas posteriormente con agua corriente.

III.1 PRUEBAS DE GERMINACION

Grupos de 30 semillas se colocaron en cajas de Petri conteniendo 7 ml de solución Hoagland (Dunn y Arditti, 1968), con diferente concentración de NaCl (0, 25, 50, 100, 150, 200 y 250 mM); cada uno de los tratamientos se hizo por triplicado. Las cajas se mantuvieron en obscuridad en una cámara de germinación a una temperatura constante de 30°C. Cada 24 h se cambió, en cada una de las cajas, la solución nutritiva por solución fresca conteniendo su respectiva concentración de NaCl. El porcentaje de semillas germinadas, que expresa el número de plántulas que puede producir un número dado de semillas (Hurtmann 1986), se valoró a los 2, 5 y 7 días de haberse iniciado el tratamiento, considerándose como germinada aquella semilla en la que las primeras hojas habían surgido, estableciéndose como un organismo fotosintético, lo que ha sido considerado como la fase final del proceso de germinación (Duffus y Laugther, 1992).

III.2 CULTIVO DE PLANTULAS

Grupos de aproximadamente 800 semillas, desinfestadas como se señaló antes, se colocaron sobre mallas de acero inoxidable (de 31 X 21 cm y una apertura de 3.5 mm), estando en contacto con el agua contenida en una charola de plástico. El número de estos grupos fue el mismo que el de las concentraciones de sal utilizadas en los experimentos que se describen en las secciones siguientes. Las semillas se mantuvieron así, durante 3 días, en una cámara de germinación con temperatura de 30°C y oscuridad constantes. Al término de este tiempo y habiéndose introducido la raíz (aprox. 3 cm) en la malla, se cambió el agua por solución nutritiva Hoagland conteniendo las distintas concentraciones de NaCl. Las charolas se transfirieron a una cámara de crecimiento que mantiene un fotoperiodo de 14 h luz-10 oscuridad, una intensidad luminosa de aproximadamente 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ (40 $\mu\text{Einstein}$), y una temperatura de 28°C en el día y de 26 en la noche. El volumen inicial de la solución de todos los tratamientos se ajustó diariamente con agua destilada.

La toma de muestras para las determinaciones que se detallan en páginas posteriores, se realizó en los días que a continuación se indican:

<u>Determinación</u>	<u>Días de tratamiento</u>	<u>Días de desarrollo</u>
-Determinación de biomasa.	6	9
-Cuantificación de iones.	3, 5 y 7	6, 8 y 10
-Cuantificación de prolina.	3, 5 y 7	6, 8 y 10
-Obtención de patrones protéicos.	1, 3, 5 y 7	4, 6, 8 y 10
-Semipurificación de P-40.	5	8

III.3 DETERMINACION DE BIOMASA

Se tomaron 5 plántulas de cada uno de los grupos de plantas crecidas en 0 y 100 mM de NaCl, para determinar en una balanza analítica el peso fresco de su raíz, tallo y hoja; el tejido se secó posteriormente a 70°C durante 48 h. Pasado este tiempo se volvió a cuantificar el peso de cada una de las muestras. Estas determinaciones se realizaron por triplicado.

III.4 CUANTIFICACION DE IONES

Se tomaron 20 mg de peso seco de cada uno de los tejidos de las plantas tratadas con distinta concentración de NaCl (0, 50, 100 y 150 mM), para digerirlos durante 48 h con 4 ml de ácido nítrico concentrado y con ayuda de calor. Después de esto, los digeridos se filtraron con papel y se aforaron a 50 ml con agua destilada. En este filtrado se determinaron los niveles de los iones Na^+ y K^+ por flamometría, y Ca^{++} y Mg^{++} por espectrofotometría de absorción atómica (Pye Unicam, 1975). Este análisis se realizó, en su totalidad, por lo menos en tres ocasiones para cada una de las muestras.

III.5 CUANTIFICACION DE PROLINA

Los niveles de este aminoácido se determinaron siguiendo un método descrito por Singh y Paleg (1973); la reacción de prolina con el compuesto ninhidrina, en un pH ácido, produjo un compuesto colorido que se cuantificó por espectrofotometría. Para ello se utilizaron 250 mg de tejido fresco (raíz, tallo u hoja) de las plantas sometidas a distinto tratamiento. Se elaboró una curva patrón

del aminoácido en el intervalo de 0 a 300 nmoles. Estas determinaciones se realizaron por triplicado.

III.6 PATRONES PROTEICOS

La raíz, el tallo o la hoja (3 g de cada uno de ellos), de plantas crecidas sin y con NaCl 100 mM, durante 1, 3, 5 y 7 días, se homogeneizaron, a 4°C, en tres volúmenes de amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.0, conteniendo PMSF 1 mM; se filtró y se centrifugó a 1550 x g durante 10 min; para después precipitar la proteína del sobrenadante con 0.5 volúmenes de TCA al 30% y frío. Los precipitados obtenidos después de centrifugar 10 min a 1550 x g, se lavaron durante 6 ocasiones con metanol-éter 1:1, para posteriormente resuspender en una solución que contenía: tris-HCl 0.125 M, SDS 4%, glicerol 20% y mercaptoetanol 10%, todo a un pH de 6.8. Las soluciones se calentaron en un baño a 95°C durante 5 min, para después cuantificar la proteína en cada una de ellas por el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

Se sembraron y separaron 100, 50 ó 5 µg de proteína total de cada una de las muestras, utilizando para ello geles de poliacrilamida sistema desnaturalizante (Laemmli, 1970) con una T=10 o con un gradiente continuo de T= 10-16. Las placas en donde se separaron 100 ó 50 µg se tiñeron con azul de Coomassie (Laemmli op. cit.), mientras que en las que se sembraron 5 µg se tiñeron con plata amoniacal (Oakley et al., 1980). En algunas de estas placas se incluyeron marcadores de peso molecular en el intervalo de 14.4 a 97.4 kD.

III.7 SEMIPURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE P-40

Con la finalidad de semipurificar una proteína de aproximadamente 40 kD (P-40) que se incrementaba en la raíz de las plántulas expuestas a 100 mM de NaCl, se procedió a realizar lo siguiente, manteniendo a lo largo del procedimiento una temperatura de 4°C.

Aproximadamente 60 g de raíz de plántulas con 8 días de desarrollo y 5 de tratamiento con NaCl, se homogeneizaron con 3 volúmenes de un amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.0, conteniendo PMSF 1 mM; el extracto se centrifugó durante 10 min a 3150 x g, y al sobrenadante obtenido, estando en agitación, se le agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta una concentración final de 50%. Se realizó otra centrifugación de 10 min a 18,000 x g, para después agregar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al sobrenadante, hasta completar una concentración final de 85%. Posteriormente se centrifugó nuevamente a 18,000 x g, y el precipitado obtenido se disolvió en 2 ml del buffer de homogeneización, para después dializar durante 24 h con 4 cambios de agua destilada, de aproximadamente 2 l cada uno.

El dializado se centrifugó a 28,300 x g durante 5', para luego fraccionar las proteínas del sobrenadante en una columna de Sephadex G-200, de aproximadamente 1.2 cm de diámetro por 57 de largo. El amortiguador de elución utilizado fue Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, con un flujo aproximado de 2.5 ml/15 min. Previo a la separación de proteínas se usó Azul Dextrán 2000 para calcular el volumen vacío de la columna.

Después de fraccionar se midió la absorbancia a 278 nm, y los

picos de proteína obtenidos se trataron con el mismo buffer en el que se resuspendieron las pastillas de proteína (ver sección "Patrones protéicos"); se calentó en baño maría para luego correr un gel de poliacrilamida sistema desnaturizante (Leammli *op. cit.*), con la finalidad de saber a cual de estos picos pertenecía P-40. Conseguido esto, se utilizó un gel similar al anterior pero sin SDS (gel "nativo"), para separar las proteínas del "pico" conteniendo P-40, habiéndolas tratado con el mismo buffer de resuspensión, pero también sin SDS.

III.8 AISLAMIENTO DE VACUOLAS

La obtención de vacuolas se realizó, esencialmente, por medio de la lisis de protoplastos, los que se obtuvieron utilizando una metodología ya descrita (Potrykus y Shillito, 1986), con algunas modificaciones.

Aislamiento de protoplastos

Las semillas se desinfectaron exponiéndolas durante 30 min a hipoclorito de sodio comercial sin diluir; se enjuagaron después con agua destilada estéril y se mantuvieron, durante 36 h y en la obscuridad, en cristalizadores que contenían una pequeña capa de agua estéril. Al final de este tiempo, las radículas que surgieron (10 g), se cortaron transversalmente en fragmentos de aproximadamente 3 mm y se colocaron en un cristalizador que contenía 30 ml de un medio compuesto por: manitol 700 mM, KH_2PO_4 0.2 mM, KNO_3 1.0 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 mM y celulasa y pectinasa, 2000 y 142 unidades, respectivamente.

Se incubó durante 5 h a 30°C y con una agitación de 60 r. p. m.

El digerido obtenido se filtró en una malla de nylon con una apertura de 70 μ m, se diluyó la solución hasta tener el manitol a una concentración de 0.6 M y se centrifugó después a 780 x g durante 20 min a 10°C. El precipitado se resuspendió en 8 ml de sacarosa 0.7 M, se repartió en dos tubos de centrifuga, cubriendo a cada uno de ellos con 4 ml de una solución conteniendo sacarosa 350 mM y manitol 300 mM (este último en Mes-Tris 25 mM pH 6.5), y con una capa de 2 ml de manitol 0.6 M en Mes-Tris. Después de centrifugar durante 10 min a 285 x g los protoplastos quedaron en la interfase manitol/manitol: sacarosa.

Aislamiento de vacuolas

La solución de protoplastos se diluyó con 1 volumen de Tris-HCl 25 mM, pH 8.0, que contenía el detergente CHAPS a una concentración de 0.75 mM. Después de 10' se le agregó a esta solución dos partes de sacarosa 0.6 M con CHAPS 0.75 mM, y a cada 6 ml de esta mezcla se le cubrió, en tubos de centrifuga, con 1.5 ml de manitol 0.6 M en Mes-Tris 25 mM, pH 6.5. Se centrifugó durante 5 min a 130 x g y las vacuolas se encontraron en la superficie de la capa superior.

III.9 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Con la finalidad de conocer si existían diferencias estadísticamente significativas entre los valores de peso (fresco y seco) de los distintos órganos de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos, se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, utilizando una dócima unilateral. La hipótesis alternativa (H_a) "existe diferencia estadísticamente significativa entre las plantas del grupo control y experimental", únicamente fue aceptada cuando $U < T_{0.05}$; siendo U el valor calculado y $T_{0.05}$ el valor de tabla a un nivel de significancia de 0.05.

Se utilizó también un Análisis de Varianza Factorial para evaluar los efectos que tenían los factores salinidad y tiempo (tiempo de exposición al NaCl) en la concentración de los distintos iones cuantificados. Esto también permitió conocer si existía alguna interacción entre ambos factores. En el momento que sea necesario mencionar los resultados de esta prueba se manejará la notación F_e como el valor estadístico "F" obtenido a partir de los datos, y F_t como el valor crítico de "F" tomado de tablas al nivel 0.01 de confianza.

IV.-RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1 GERMINACION Y CRECIMIENTO DE PLANTULAS BAJO CONDICIONES SALINAS.

Como ya se mencionó, el primer objetivo de este trabajo consistió en valorar el grado de resistencia que presentaba el frijol mungo al estrés salino, en sus primeras etapas de desarrollo. Para ello se determinó el porcentaje de semillas que germinaban en distinta concentración de NaCl (Cuadro I), así como la producción de biomasa que se obtenía bajo estas condiciones (Figura 1).

El proceso de germinación se llevó a cabo en las semillas del grupo control y en las expuestas a las 4 primeras concentraciones de sal utilizadas (25 a 150 mM); sin embargo, la velocidad con la que ésta se realizó disminuyó en 100 y 150 mM. Concentraciones superiores (200 y 250 mM), fueron completamente inhibitorias, al menos hasta el día en que se realizó la última valoración (7° día). Estos resultados concuerdan con los de una investigación en donde se trabajó con esta misma especie (Imamul y Larher, 1983), y en donde se observó que la germinación se realizaba, desde el segundo día de tratamiento, en concentraciones de hasta 150 mM de NaCl, mientras que las plántulas emergían en el cuarto día. Una concentración de 200 mM de la sal también inhibía este proceso. De manera distinta, en un trabajo realizado con dos cultivares de frijol mungo, AUMg588 y Mg6601 (Ashraf y Rasul, 1988) encuentran que el porcentaje de germinación decrece drásticamente en soluciones salinas con conductividades eléctricas similares a las que aquí se manejaron, llegando hasta un

50%, con respecto al control, en una salinidad de aproximadamente 150 mM. En ninguno de estos trabajos señalan la forma en que se valoró la germinación.

<u>CONCENTRACIÓN mM DE NaCl EN HOAGLAND</u>	<u>% DE GERMINACION</u>
0	98 ⁺ - 2 ^A
25	99 ⁺ - 2 ^A
50	97 ⁺ - 3 ^A
100	97 ⁺ - 3 ^B
150	93 ⁺ - 3 ^C
200	-----
250	-----

CUADRO I.- Germinación de semillas de frijol mungo expuestas a diferente concentración de NaCl. A, B y C son 2, 5 y 7 días, respectivamente, en los que se observó el surgimiento de las primeras hojas definitivas. n= 3 + D.E.

Los efectos provocados por la sal, disminución en la velocidad de germinación y una inhibición a altas concentraciones de NaCl (>150 mM), pueden deberse a una reducida absorción de agua por parte de las semillas germinantes y/o a los efectos tóxicos que los iones Na⁺ y Cl⁻ pueden ejercer sobre ellas.

Con respecto a los resultados de los efectos que el NaCl tiene sobre el crecimiento del frijol mungo (Figura 2), se puede observar que la parte aérea (tallo y hoja), pero no la raíz, es afectada en lo referente a peso fresco; mientras que los dos primeros órganos disminuyen en un 25 y 39%, respectivamente, la raíz sólo decrementa un 6%. El estadístico utilizado (Mann-Whitney) apoya lo anteriormente dicho para la hoja ($U < T_{0.05}$) y la raíz ($U > T_{0.05}$), pero no para el tallo ($U = T_{0.05}$).

Cuando nos referimos al peso seco (Figura 2B), vemos que la raíz no se ve afectada por la sal en el parámetro en cuestión, a pesar de ser la parte de la planta que está en contacto directo con la solución estresante. Como se muestra más adelante (Figura 3) en condiciones de salinidad este órgano presenta una alta concentración del ion sodio, lo que posiblemente produce un diferencial osmótico entre la planta (o más específicamente la raíz) y el medio externo, generando así un incremento en la turgencia de las células radiculares. Esto último es apoyado por el hecho de que el estrés salino no genera cambios en el estado hídrico del órgano mencionado (Figura 2 C).

Una disminución en el peso fresco pero no en el seco, como es el caso del tallo, indica que el tejido está reduciendo su hidratación, y que a pesar de ello la planta conserva la capacidad de seguir produciendo una biomasa similar a las del grupo control. En lo referente a la hoja, este es el único órgano que presenta una tendencia a reducir su producción de biomasa (un 18% aprox.) bajo condiciones de salinidad, a pesar de que el análisis estadístico

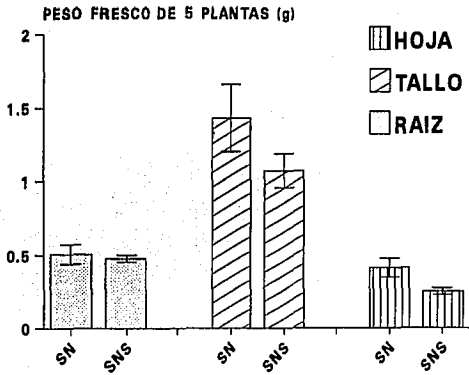
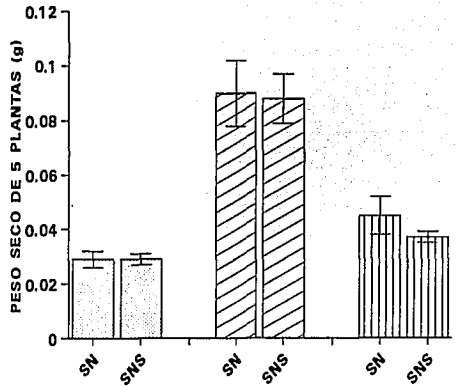
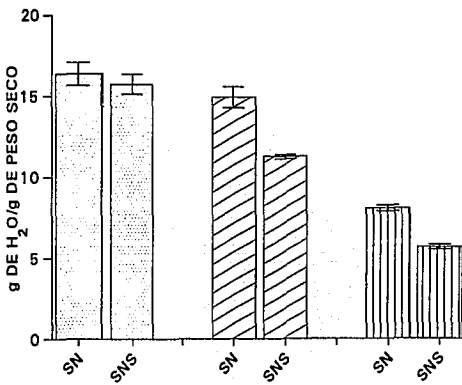
A**B****C**

FIGURA 2.- Peso fresco (A), seco (B) y contenido de agua (C) de las distintas partes del frijol mungo cultivado durante 6 días en solución nutritiva (SN) y solución nutritiva con NaCl 100 mM (SNS). n=3 + D.E.

aplicado señala que esta diferencia no es significativa ($U > T_{0.05}$); la disminución en la producción de biomasa foliar puede ser explicado por alguno de los siguientes mecanismos (Neumann, et al., 1988):

a) la reducción en el potencial hídrico en la zona radicular puede ser transmitida, vía xilema, a las hojas, en donde puede presentarse un decremento en la turgencia celular.

b) el estrés salino puede reducir la velocidad de expansión celular en la hoja, al inducir una disminución en la extensibilidad de la pared celular.

En experimentos realizados con plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) se demostró que una salinidad de 50 y 100 mM de NaCl afectaba la velocidad de crecimiento foliar al inducir un decremento en la turgencia, más que por afectar las propiedades de la pared celular. De manera interesante, la salinización a más largo plazo (10 días) llevó a un aparente ajuste mecánico (incremento en la extensibilidad de la pared) que podría contrarrestar la reducción en la turgencia, manteniendo así el crecimiento de la hoja (Neumann, *op. cit.*). La disminución en biomasa foliar obtenida en la presente investigación puede deberse también a una disminución en la turgencia, pues como se observa en la Figura 2 C, este tejido presenta un considerable déficit hídrico.

La reducción en peso fresco y seco de la hoja puede entenderse también como un decremento en el área foliar, que resultaría en una menor transpiración, y por ende, en una menor pérdida de agua, lo que hasta cierto punto sería benéfico para el vegetal durante el estrés salino. Además, la inhibición de la expansión celular de la hoja

puede traer consigo una reducción en el consumo de carbono y energía en este órgano, con lo que posiblemente se logre abastecer de una mayor proporción de asimilatos y fotosintatos a la raíz, proveyéndole así de la energía necesaria para llevar a cabo su adaptación, mediante la compartimentalización iónica o la síntesis de solutos osmocompatibles.

El comportamiento que pudo haber seguido la planta en etapas de desarrollo posteriores, y bajo un estrés salino, no fue abordado en este trabajo, sin embargo, existen algunos reportes al respecto (Ashraf y Rasul *op. cit.* y Salim y Pitman, 1988). En todos ellos las valoraciones se hicieron, por lo menos, a los 28 días de haberse iniciado el tratamiento con sal, encontrando, en promedio, una inhibición en la formación de biomasa del 65 al 75%, en plantas creciendo en una salinidad de 100 mM de NaCl o equivalente. En el último de estos estudios (Salim y Pitman *op. cit.*), la valoración se hizo hasta las 14 semanas, junto con la determinación de la producción de semillas; en ella se observó que las plantas sometidas a 150 mM de la sal morían a la quinta semana de estrés (7 de desarrollo), mientras que las que eran cultivadas en 50 y 100 mM llegaban a la madurez y producían semillas en un 63 y 21%, respectivamente, con respecto a las control.

Así, los resultados encontrados en el presente trabajo permiten decir que durante las etapas estudiadas, germinación y plántula, el frijol mungo presenta una considerable resistencia a la sal; hasta 150 y 100 mM, respectivamente. Sin embargo, como lo señalan las otras investigaciones mencionadas, esta resistencia parece disminuir

conforme se avanza en el desarrollo de la planta; a pesar de ello, la planta parece adaptarse al NaCl, como lo demuestra el hecho de que puede seguir produciendo semilla (21% con respecto al control) en 100 mM de NaCl.

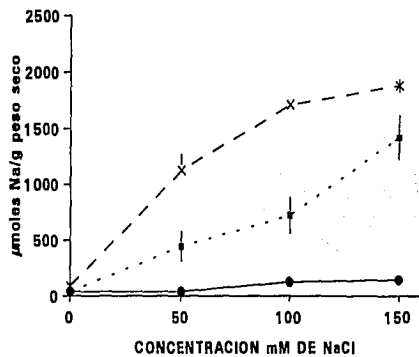
Considerando esto, se procedió después a determinar los niveles del Na⁺ en los distintos órganos del frijol mungo, con la finalidad de conocer si dicho vegetal evadía o toleraba la salinidad; para ello se utilizaron concentraciones de sal en el intervalo de 0 a 150 mM. La última de estas concentraciones, que como ya se mencionó es nociva para plantas de 7 semanas de desarrollo, fue utilizada con la intención de ver cómo se comportaba el contenido de algunos iones (ver las dos secciones siguientes), bajo condiciones que se podrían considerar como severas o tóxicas.

IV.2 NIVELES DE SODIO

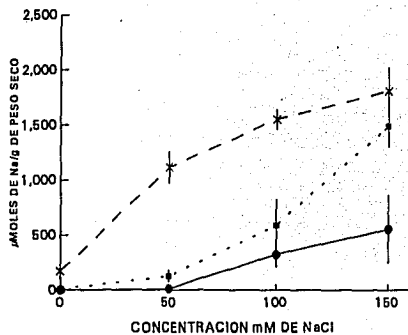
El incremento de NaCl en el medio de crecimiento de las plantas lleva a que el Na⁺ se acumule considerablemente en la raíz (Fe=492.17, Ft=3.4) y en menor grado en el tallo (Fe=68.79) y en la hoja (Fe=42.45) (Figura 3).

A diferencia de la raíz, en donde prácticamente no existe variación en el comportamiento de este ion, entre los 3 días en que se realizaron las determinaciones (Fe=7.64, Ft=5.61), el tallo y la hoja presentan un incremento en sus niveles conforme se avanza en el desarrollo de la planta (Fe=8.54 y 25.23, respectivamente), en concentraciones de 100 y 150 mM de NaCl. Sin embargo, las concentraciones encontradas en estos dos órganos son siempre menores

A
 ×-RAIZ ·-TALLO ◊-HOJA



B



C

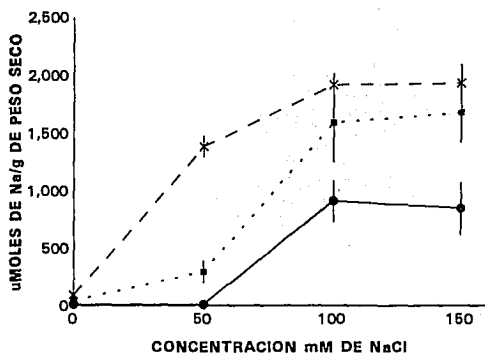


FIGURA 3.- Niveles de Na⁺ en los diferentes órganos de plantas cultivadas durante 3 (A), 5 (B) y 7 días (C), en distinta concentración de NaCl. n = 3 + D.E.

a las que se valoraron en la raíz (Figura 3).

El análisis estadístico utilizado apoya la existencia de una interacción entre los factores salinidad y tiempo, que provoca cambios en los niveles de Na^+ a nivel foliar ($F_e=10.42$, $F_t=3.67$). Para el caso del tallo y la raíz no se da esta relación ($F_e=3.18$ y 2.5 , respectivamente); esto parece deberse a que las partes basales de la planta, sobre todo la raíz, se encontraban, desde el tercer día de tratamiento, en un estado iónico "estable" o de saturación que no varió durante los días en que se realizaron las determinaciones.

A partir de lo antes expuesto, podemos decir que cuando se expone al frijol mungo a un estrés con NaCl , la raíz es el órgano que acumula una mayor cantidad del ion tóxico Na^+ , reduciéndose la cantidad de éste conforme se avanza hacia la parte superior del vegetal. La restringida translocación del Na^+ , hacia las partes superiores del vegetal, es causada por una acumulación selectiva de este ion en las células del parénquima del xilema de raíz (Kramer et al., 1977, citado por Horst, 1990) y tallo (Rains, 1969, citado por Horst, op. cit.). La acumulación de Na^+ en estas células puede deberse a un proceso de intercambio Na^+/K^+ ; de hecho, en *Atriplex hastata* se ha demostrado, por microanálisis con rayos X, que la proporción K^+/Na^+ es muy baja en las células parenquimáticas, comparada con la de los vasos del xilema adyacente.

La mayor acumulación de Na^+ en la raíz puede estar dada también por una retranslocación de este ion, desde el tallo y la hoja, hacia dicho órgano, como ha sido reportado para *Phaseolus vulgaris* (Jacoby, 1964 y Lessani y Marschner, 1978); existe evidencia (Yeo et al.,

1977, citado por Horst, 1990) de que las células de transferencia del parénquima de xilema, juegan un papel clave al reabsorber Na^+ desde éste, transfiriéndolo después al floema, desde donde es translocado hasta la raíz; en este lugar el ion puede ser excretado al medio, como se ha visto en experimentos realizados en frijol común (Ossenberg-Neuhaus, 1976, citado por Lauchli, 1984). De hecho, se ha revelado también la existencia de células parenquimáticas, con función de células de transferencia, en la región proximal de la raíz de *Phaseolus coccineus* (Kramer et al., 1977, Citado por Horst, 1990). Así, la reabsorción de Na^+ desde la savia del xilema parece ser un mecanismo efectivo para restringir la translocación de este ion hacia las hojas.

La forma en que la raíz acumula el Na^+ indica que se trata de un sistema saturable, ya que, como se observa en la Figura 3, no existe una diferencia notoria entre los niveles del ion de las plantas cultivadas en 100 y 150 mM de NaCl.

El papel de la raíz como "concentrador" de Na^+ ha sido también encontrado en uno de los trabajos antes mencionados (Imamul y Larher, 1983), en donde se reportó que en plantas de frijol mungo, con 4 semanas de desarrollo y sometidas a un estrés similar al de la presente investigación, este órgano almacenaba concentraciones superiores a las de la parte aérea: aproximadamente 2500 $\mu\text{moles/g}$ de peso seco, para el vástago, y de 3500 para la raíz.

Por otro lado, los altos niveles del Na^+ antes mencionados, junto con el reporte de Salim y Pitman (1988), en donde se señala que plantas maduras de frijol mungo (14 semanas de desarrollo)

sometidas a 100 mM de NaCl presentan hasta 4000 μ moles de Na^+ por gramo de peso seco de tallo, contrastan con los valores más altos obtenidos en el presente trabajo (2000 μ moles/g de peso seco de raíz); lo que parece indicar que conforme la planta va llegando a su madurez resiste una mayor concentración del Na^+ en todos sus órganos.

La tolerancia que presenta el frijol mungo hacia el sodio podría relacionarse con un proceso adaptativo, en el que el mismo ion participara como un osmótico, disminuyendo el potencial hídrico de la planta y permitiendo que ésta siga absorbiendo agua desde el medio. La capacidad para acumular altas concentraciones de iones, como Na^+ y Cl^- , no se restringe únicamente a plantas halófilas, pues se ha demostrado que células de *Nicotiana tabacum* L. var Wisconsin 38, adaptadas a la salinidad (428 mM de NaCl), acumulan estos iones en sus vacuolas hasta en una concentración de 780 mM, en tanto que en su citoplasma los niveles no rebasan 100 mM (Binzel, et al. 1988).

IV.3 NIVELES DE K^+ , Ca^{++} Y Mg^{++} .

Con la intención de conocer si la presencia de NaCl provocaba, aparte del ya mencionado aumento en la concentración tisular del ion Na^+ , un desbalance en otros elementos que sí son esenciales para el vegetal, se decidió determinar los niveles de K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} , (Figuras 4, 5 y 6).

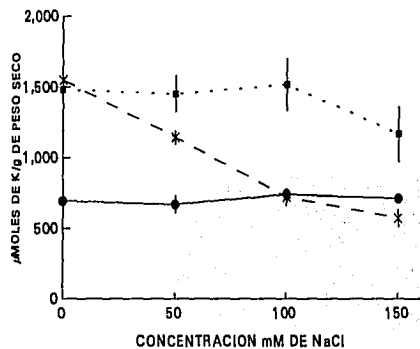
Para el caso del K^+ (Figura 4), podemos observar que el aumento de NaCl en la solución nutritiva produce una disminución en la concentración de este ion en raíz ($\text{Fe}= 239.42$, $\text{Ft}=3.4$) y, aunque en menor grado, en tallo ($\text{Fe}=25.28$), en los tres días en que se hicieron

las determinaciones; de forma inversa, la hoja mostró sólo un ligero incremento en K^+ (Fe=7.075, cuando se presentó el estrés).

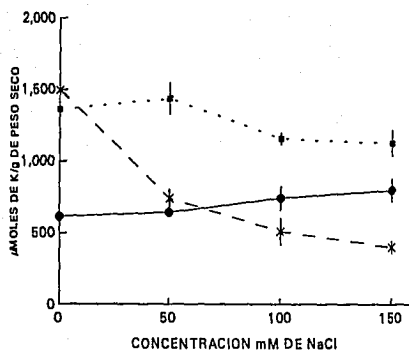
El decremento de K^+ en raíz y tallo, que se asocia claramente con un incremento en la concentración de Na^+ (Figura 3), parece deberse a que la sal (NaCl) desplaza al Ca^{++} de la membrana plasmática, alterando la permeabilidad de ésta (Cramer et al., 1985); se sabe que el Ca^{++} protege la membrana plasmática, manteniendo su integridad y por lo tanto un transporte iónico apropiado. Se ha dicho también que el desplazamiento del Ca^{++} se relaciona con un eflujo de K^+ desde la raíz (Kramer et al. 1986), y que los altos niveles de Ca^{++} en el medio de cultivo de la planta atenúan los efectos adversos provocados por un estrés salino, manteniendo una adecuada concentración de K^+ intracelular, y con ello un buen crecimiento en dichas condiciones (Nakamura et al., 1990).

El decremento de K^+ en raíz y tallo, no es, sin embargo, tan severo como para alcanzar el "nivel mínimo" (1% con respecto al peso seco o 250 μ moles/g de peso seco) que se ha reportado (Epstein, 1972) puede permitir un crecimiento normal de la planta. En cuanto al K^+ foliar, se puede pensar que el pequeño incremento mostrado se relaciona con el decremento que éste presenta en el tallo, pues una de las características que tiene este ion es la alta movilidad a todos los niveles de la planta (entre células, tejidos, así como un transporte a larga distancia, vía xilema y floema (Horst, 1990). Este aumento posiblemente sea necesario para que el K^+ se involucre, bajo un estrés salino, en alguna(s) de las múltiples funciones que se ha dicho tiene en los vegetales: activación de enzimas, regulación de

A
 -x- RAIZ -o- TALLO -●- HOJA



B



C

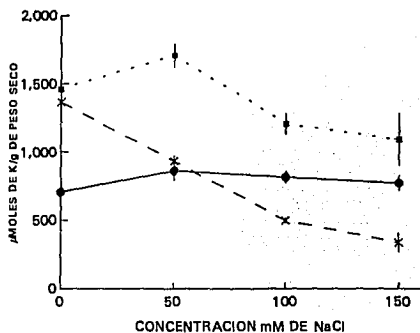


FIGURA 4.- Niveles de K⁺ en los diferentes órganos de plantas cultivadas durante 3 (A), 5 (B) y 7 días (C), en distinta concentración de NaCl. n = 3 + D.E.

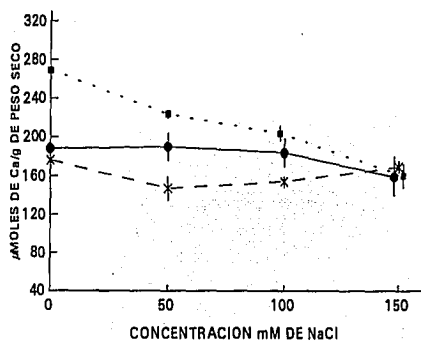
transporte membranal, neutralización de aniones y mantenimiento de un potencial osmótico adecuado (Clarkson y Hanson, 1980).

El papel del K^+ como osmótico parece ser de vital importancia en la hoja, ya que, a diferencia del tallo y la raíz, en este órgano no se presentan altas concentraciones de Na^+ , del que se ha dicho (Clarkson y Hanson *op. cit.*) puede reemplazar al K^+ en su función como osmótico. A nivel foliar el Na^+ y el K^+ , juntos, pueden estar involucrados en la osmorregulación de la célula.

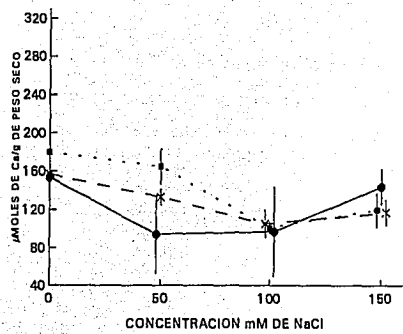
El fenómeno de desplazamiento del Ca^{++} membranal antes mencionado, junto con el reporte que señala que el eflujo de este ion incrementa en células radiculares de maíz tratado con NaCl (Lynch y Lauchli 1988), podrían explicar también la disminución encontrada para el Ca^{++} en los tres órganos (Figura 5), con excepción de las concentraciones mostradas para raíz y hoja en 150 mM de NaCl, en el tercer y quinto día de estrés, respectivamente. Otra causa de esta disminución podría ser la acumulación preferencial de Na^+ , que se ha dicho (Kramer et al., 1977, citado por Horst, 1990) presentan las células parenquimáticas del xilema de raíz. La prueba estadística aplicada apoya el decremento de este ion en raíz ($Fe=29.4$, $Ft=3.4$) y tallo ($Fe=60.62$), pero señala que no existen cambios significativos en la hoja ($Fe=2.22$).

El decremento en la concentración de Ca^{++} ya había sido demostrado en frijol mungo sometido durante 28 días a estrés salino (Imamul y Larher, 1983), y al parecer este efecto de la salinidad sobre la captación de dicho ion, su transporte y fijación a la membrana, se da en un gran número de vegetales (Rengel, 1992), y para

A
 *---RAIZ ···TALLO ◆---HOJA



B



C

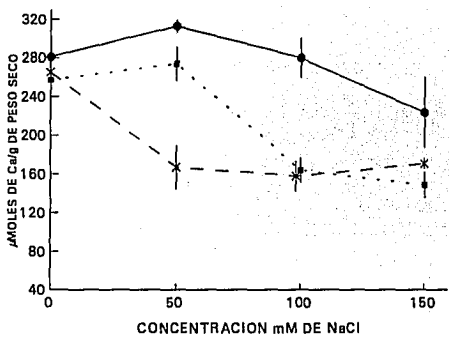


FIGURA 5.- Niveles de Ca⁺⁺ en los distintos órganos de plantas cultivadas durante 3 (A), 5 (B) y 7 días (C), en diferente concentración de NaCl. n= 3 + D.E.

algunos autores ésta es la causa principal de inhibición del crecimiento vegetal producida por el NaCl (Cramer y Lauchli, 1986, en Rhodes, 1987).

En la presente investigación, en ocasiones se llegó a concentraciones de Ca^{++} menores a las que se han mencionado (Epstein, 1972), deben de existir en el vegetal para que éste tenga un crecimiento adecuado ($125 \mu\text{moles/g}$ de peso seco); considerando esto, y la importancia que este ion tiene en los sistemas celulares (estabilizando la pared celular, manteniendo la integridad y la selectividad de la membrana, regulando el transporte iónico, actuando como segundo mensajero en varios procesos bioquímicos en el citosol, funcionando como osmorregulador en la vacuola, etc.) se podría decir que si los daños mostrados por el frijol mungo se debieron a un desbalance iónico, este seguramente fue el que presentó el Ca^{++} .

En lo que respecta a los niveles del Mg^{++} (Figura 6), ion del que se conoce aún menos acerca del papel que juega en la resistencia a la sal, en este trabajo se encontró que sus niveles tienden a aumentar en la raíz conforme se incrementa el NaCl en la solución nutritiva ($\text{Fe}=7.18$, $\text{Pt}=3.4$), mientras que en la parte aérea (tallo y hoja) se da una disminución en su concentración ($\text{Fe}=10.89$ y 8.85 , respectivamente).

El incremento del Mg^{++} a nivel radicular y la disminución encontrada en vástago, bajo estrés salino, posiblemente se deban a que este catión está siendo utilizado en algún proceso de adaptación en la raíz. En el laboratorio en donde se realizó este trabajo (datos no publicados), así como en otra investigación (Kasamo y Nouchi,

1987) se ha visto que el Mg^{++} activa la ATPasa de membrana plasmática en raíz de frijol mungo. En teoría, esta enzima genera la energía necesaria para que en la célula exista un eflujo de iones tóxicos, como el caso del ion Na^+ en la raíz del vegetal estudiado. Otra enzima que también es activada por el Mg^{++} es la H^+ -ATPasa de tonoplasto (Garbarino y dupont, 1988 y Reuveni et al., 1990), cuya función es crear un gradiente protónico que puede ser utilizado para introducir iones como el Na^+ a la vacuola, evitando así sus efectos nocivos en el citosol. Aparte de este papel del Mg^{++} como activador de enzimas, se puede señalar que ion forma parte del compuesto Mg-ATP, que es el verdadero sustrato de las ATPasas antes mencionadas. Aún más, la síntesis de ATP ($ADP+Pi \rightarrow ATP$) tiene un requerimiento absoluto por Mg^{++} , como componente entrecruzador entre el ADP y la enzima ATPsintetasa (Horst, 1990), pudiéndose destacar así la necesidad que de este ion se podría tener a nivel radicular.

Se sabe que la concentración promedio de Mg^{++} requerido por los vegetales (Epstein, 1972) es de aproximadamente 80 μ moles/g de peso seco, y que un aumento en este nivel resulta en un almacenamiento del ion en la vacuola, predominantemente en forma de sales, al actuar como "contraiones" de los aniones orgánicos e inorgánicos contenidos en este organelo. Los niveles de Mg^{++} encontrados aquí, para el vástago, siempre estuvieron por encima del valor mencionado (Figura 6). Por otro lado, se ha demostrado que solo una relativamente pequeña proporción, del total de Mg^{++} existente en los vegetales, es utilizado para las múltiples funciones que este catión realiza en el cloroplasto y citoplasma (Kirkby y Mengel, 1976, citado en Horst,

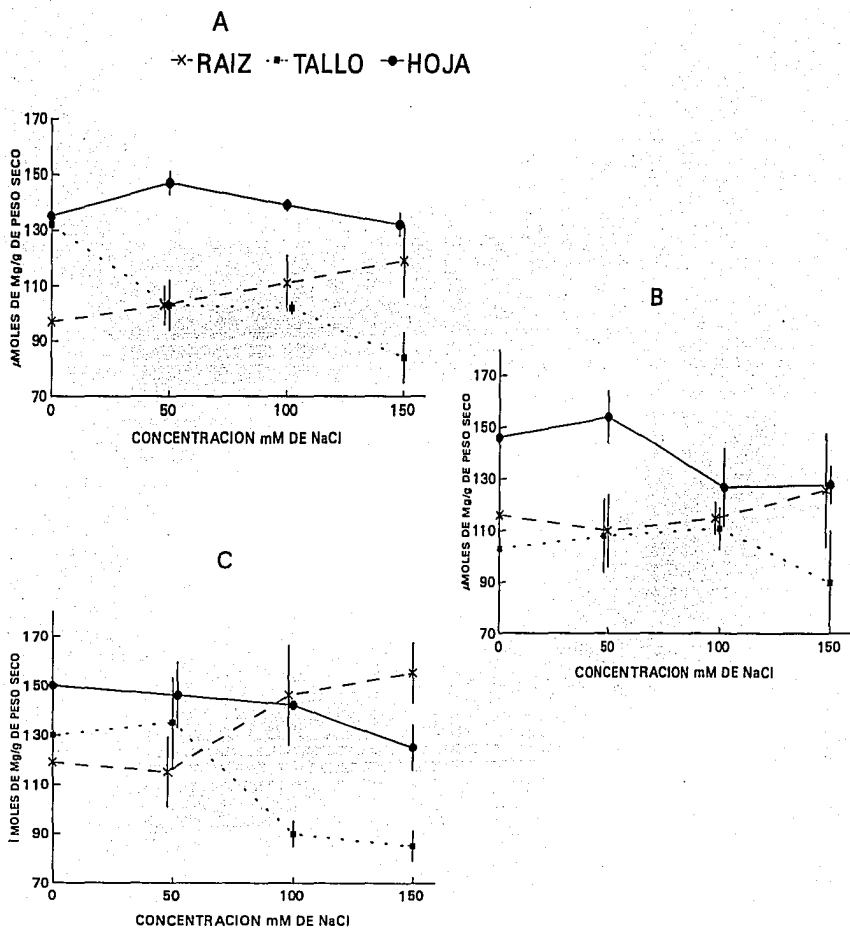


FIGURA 6.- Niveles de Mg^{++} en los diferentes tejidos de plantas cultivadas durante 3 (A), 5 (B) y 7 días (C), en distinta concentración de NaCl. n= 3 + D. E.

1990), por lo que podemos suponer que la disminución del Mg^{++} en vástago no produce efectos dañinos en el frijol mungo sometido a estrés salino.

A partir de lo discutido en esta sección y la anterior (IV.2), se ha planteado, de manera simplificada, un modelo que ilustra el comportamiento y las interacciones de los iones que se cuantificaron en plántulas de frijol mungo, sometidas a un estrés con NaCl (Figura 7).

El decremento encontrado en biomasa foliar puede ser resultado, como ya se ha mencionado, de una deficiencia de iones como el Ca^{++} , provocada por el NaCl. Sin embargo, se podría pensar también que este decremento es debido a una disminución en la velocidad de fijación neta de CO_2 , causada por el déficit hídrico y el cierre estomático parcial, que normalmente se presentan bajo un estrés salino. Aún más, existe la posibilidad de que este déficit hídrico afecte la expansión foliar pero no la actividad fotosintética; de ser así, se reduciría el consumo de carbono y energía en la hoja, permitiéndose con ello que una mayor proporción de fotosintátos pudieran ser distribuidos a los órganos basales, contribuyendo así con los mecanismos de adaptación que estos pueden estar desarrollando y soportando con ello un mejor crecimiento.

El aumento drástico en la concentración de Na^+ en todos los órganos, como ya se mencionó, podría contribuir a una disminución en el potencial hídrico de la planta, lo que llevaría a que el agua pudiera seguir siendo absorbida por ésta para el mantenimiento de su crecimiento (Yeo 1983). No obstante, se sabe que este ion no es

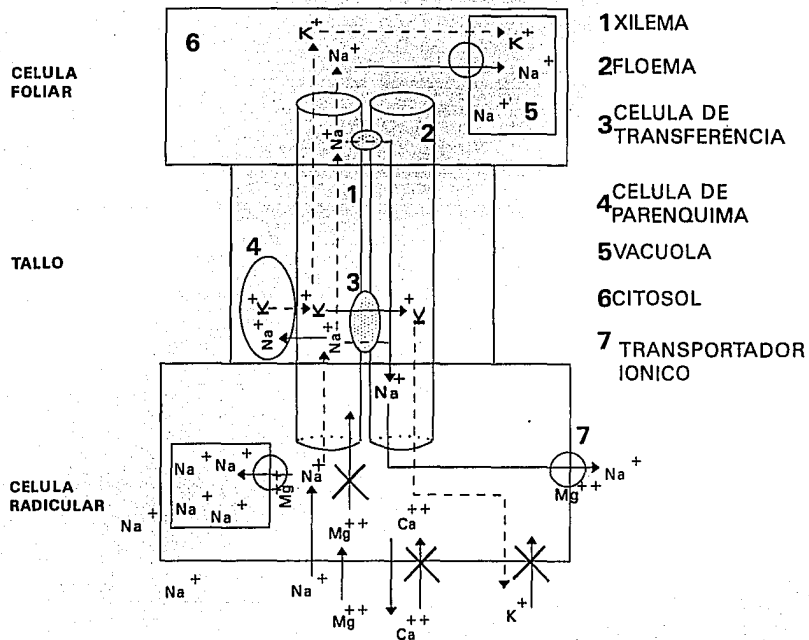


FIGURA 7.- Flujo y distribución de los iones cuantificados en plántulas de frijol mungo sometido a un estrés con NaCl.

tolerado, generalmente, a nivel del citosol (Flowers et al., 1977), sino que es almacenado a nivel vacuolar. Como consecuencia de este almacenamiento, el K^+ (Jeshke y Nassery, 1981) y/o algunos solutos orgánicos como la prolina y la betaína (Hellebust, 1976) se acumulan en el citoplasma, funcionando como osmorreguladores. El decremento encontrado en el K^+ (raíz y tallo), nos llevó a suponer como poco probable que este ion tuviera dicho papel, por lo que se consideró adecuado determinar los niveles de otros solutos, los que también se ha propuesto tienen esta función.

IV.4 NIVELES DE PROLINA.

Como se mencionó en la introducción, diversos autores proponen algunos azúcares, aminoácidos y diversos compuestos nitrogenados, como solutos que ayudan a que la célula vegetal se ajuste osmóticamente, después de un desbalance provocado por la salinidad. Estos osmóticos son, en teoría, compatibles con las actividades metabólicas que se desarrollan en el citosol, lugar donde se da su incremento.

Un gran número de estos estudios, sin embargo, parecen señalar a la glicinbetaina (Wyn Jones y Storey, 1981 y Pollard y Wyn Jones, 1979) y al aminoácido prolina (Aspinall y Paleg, 1981 y Stewart, 1980), como los compuestos que más se involucran en la respuesta de osmorregulación en las plantas. Considerando esto, en el presente estudio se procedió a determinar los niveles de estas dos moléculas.

Para el caso de la betaina, desafortunadamente, no pudo detectarse este compuesto en ninguna de las muestras utilizadas. El problema parece deberse a la poca sensibilidad que tiene el método empleado (Stumpf, 1984); el cual sólo ha dado resultados positivos en plantas que contienen grandes cantidades de glicinbetaina (Hanson, comunicación personal).

En cuanto a los resultados de prolina (Figura 7), se observa, en los tres tiempos estudiados, que en las tres partes del vegetal se dio un incremento, entre el 200 y 400%, en la concentración de prolina conforme se aumentó la concentración de NaCl en el medio nutritivo. La cantidad del aminoácido fue siempre más alta en el vástago que en la raíz; pero a pesar de esto, dicho aumento parece

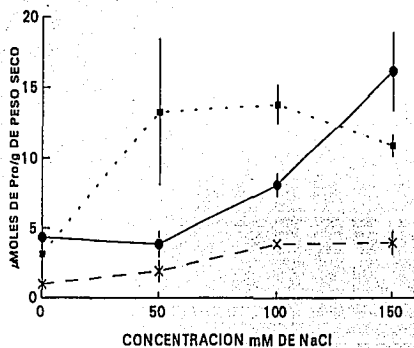
ser insignificante si lo comparamos con los incrementos que se dan en el Na^+ ; de tal forma que sería imposible que los cambios en la prolina pudieran, por sí solos, realizar un ajuste osmótico en el citosol, aún cuando consideráramos, como se ha dicho (Jeschke, 1984), que éste ocupa sólo un 5% del total de la célula, lo que podría llevar a una mayor concentración del aminoácido.

Se ha sugerido, tomando como base los resultados obtenidos en plantas de frijol mungo con 28 días de desarrollo y tratamiento con NaCl (Imamul y Larher, 1983), que la osmorregulación no está dada por una sola molécula, sino que se requiere de la participación de distintos compuestos: azúcares y aminoácidos diversos, ureidos y amidas libres, y compuestos cuaternarios como la glicinbetaína, los que aumentaron (sobre todo en raíz) cuando la planta era sometida a NaCl hasta 150 mM.

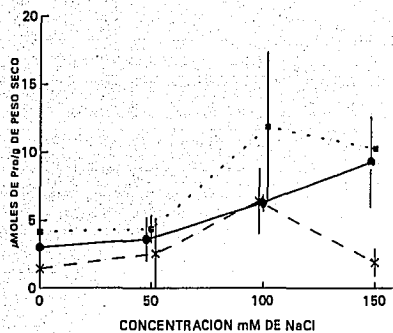
El incremento en prolina encontrado aquí, quizá se relacione con el aumento en otros compuestos que no fueron cuantificados, pero cuya producción pudo requerir de un gasto energético que trajo consigo la reducción encontrada en el crecimiento foliar.

Una idea que también se ha planteado es que los aumentos en prolina podrían relacionarse, más que con una adaptación, con un daño metabólico provocado por el estrés salino (Hanson y Nilsen, 1978 y Mofteh y Burlyn, 1987), punto que también resulta conflictivo al no existir pruebas que nos permitan decidirnos por una u otra posibilidad.

A
 * RAIZ ■ TALLO ● HOJA



B



C

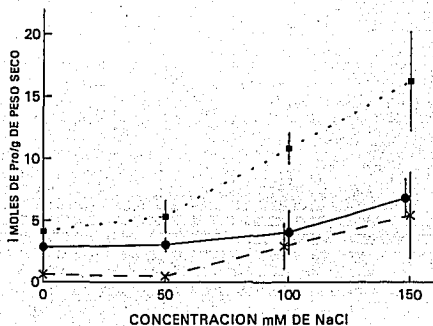


FIGURA 8.- Niveles de prolina en los diferentes tejidos de plántulas cultivadas durante 3 (A), 5 (B) y 7 días (C), en distinta concentración de NaCl. n = 3 ± D.E.

IV.5 PATRONES PROTEICOS.

Varias son las investigaciones que señalan que la adaptación de los vegetales hacia el estrés salino podría involucrar la síntesis "de novo" o la sobreexpresión de algunas proteínas. La suposición en que se basan estos estudios es que la habilidad de las plantas para crecer y sobrevivir bajo un estrés salino, se debe a alteraciones en la expresión génica, las que se exhiben como cambios en los productos génicos (RNAm y proteínas). De estas moléculas, posiblemente la que ha recibido más atención es la denominada osmotina, que fue descubierta en células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. var. Wisconsin 38) adaptadas a un estrés osmótico (Singh et al., 1985 y 1987). Otras proteínas, antigénicamente análogas a la osmotina de tabaco, han sido también detectadas en varias especies vegetales (Singh et al., 1987 y Casas et al., 1992). El nombre de osmotina es meramente descriptivo, ya que, a pesar de que esta proteína se ha estudiado extensamente (Singh et al., 1987a y Singh et al., 1989), a la fecha no se ha establecido su verdadera función.

Considerando que la resistencia del frijol mungo ante el estrés salino podría involucrar cambios en la expresión o en la síntesis "de novo" de algunas proteínas, se procedió a obtener los perfiles protéicos de la raíz, tallo y hoja de plantas creciendo con y sin NaCl en el medio. La figura 9 muestra los patrones de raíz y hoja, que fueron las partes en donde se encontraron variaciones. En ella se observa que mientras en la hoja la sal produjo un incremento en la concentración de 3 proteínas catódicas, en la raíz el estrés llevó, aparentemente, a que se sintetizara una proteína que no existía en

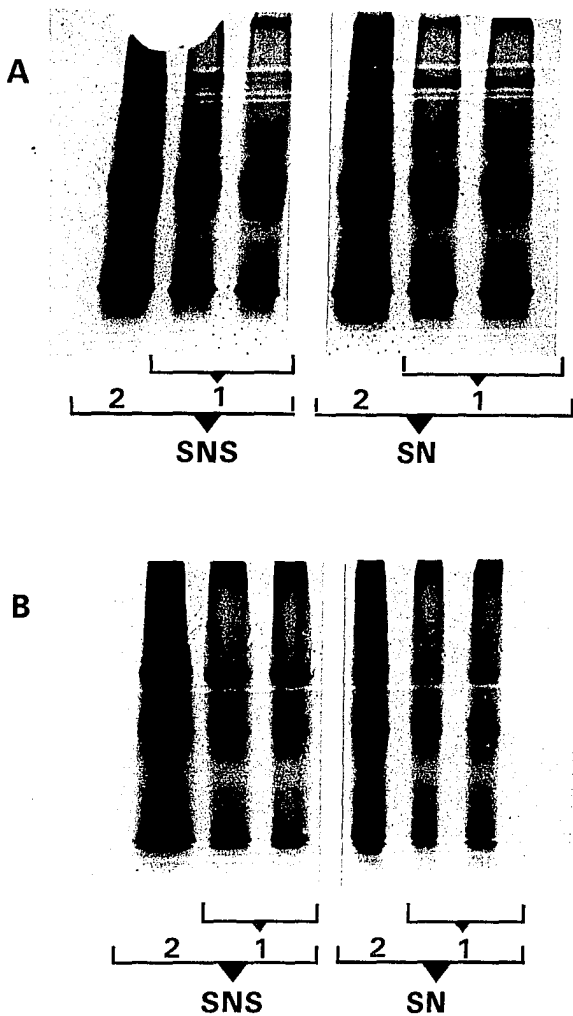


FIGURA 9.- Patrones protéicos de raíz (A) y hoja (B) de plantas crecidas en solución nutritiva (SN) y solución nutritiva con NaCl 100 mM (SNS) durante 7 días. Las flechas indican las diferencias más notorias entre ambos tratamientos. 1= 50 μ g de proteína, 2= 100 μ g. El gel fue teñido con azul de coomassie.

las plantas control.

A partir de estos resultados se decidió seguir trabajando únicamente con la raíz, en consideración de que:

-Los cambios protéicos más evidentes parecen realizarse en este órgano.

-Esta parte del vegetal parece ser la menos afectada por el estrés, en cuanto a la formación de biomasa, a pesar de que en ella se observa una mayor acumulación de Na^+ y los cambios más drásticos en los niveles de dos de los macronutrientes evaluados (K^+ y Ca^{++}).

Los dos puntos mencionados bien podrían ser reflejo de un mecanismo de resistencia que se presenta a nivel radicular, y que permite la adaptación de la planta a las condiciones estresantes señaladas.

El siguiente objetivo consistió en conocer el momento del estrés en que empezaba a sintetizarse la proteína de raíz. Para ello se obtuvieron los patrones de raíz de plantas cultivadas durante 1, 3, 5 y 7 días, en ausencia y presencia de NaCl (100 mM). El gel obtenido (figura 10) nos permite ver que la proteína en cuestión se hace más evidente desde el 5° día del estrés, no existiendo una diferencia significativa al 7° día. Sin embargo, de manera distinta a lo encontrado en el gel anterior, la proteína aquí sí se presenta, aunque en menor cantidad, en la raíz de las plantas cultivadas únicamente en la solución nutritiva (ver densitogramas de figura 11).

Los cambios protéicos detectados en la raíz de frijol mungo parecen ser resultado, más que de una síntesis "de novo", de algún proceso que permite que exista una mayor cantidad de la proteína P40 preexistente (mayor síntesis o menor degradación).

Se sabe que el método de plata amoniacal, utilizado para tefir el gel de la figura 10, presenta una mayor sensibilidad que la que involucra azul de coomassie; a pesar de esto, la primera de las técnicas no puede ser utilizada con fines cuantitativos, debido a que la reacción que se da con la plata puede variar de proteína a proteína; mientras que algunas bandas aparecen de color negro otras se presentan como cafés o amarillas (Patel et al., 1988), razón por la cual la intensidad de banda no necesariamente es indicativo de la cantidad de proteína. Tomando en cuenta esto, se utilizó la tinción con azul de coomassie para hacer más "cuantitativa" la diferencia encontrada en la figura 10. El gel obtenido de este experimento es el de la figura 12, carriles 1 y 3, cuyos densitogramas se presentan en la figura 13A y 13B, respectivamente. En esta última figura puede observarse el incremento en la proteína (pico 10) en condiciones de salinidad.

En el mismo gel (Figura 12) se separaron proteínas de peso molecular conocido (estándares), para determinar el peso de la molécula que se sobreexpreso durante el estrés salino. El resultado de este análisis arrojó un valor de 39,400 Daltons (39.4 kD), razón por la cual se decidió denominar a la proteína "P40".

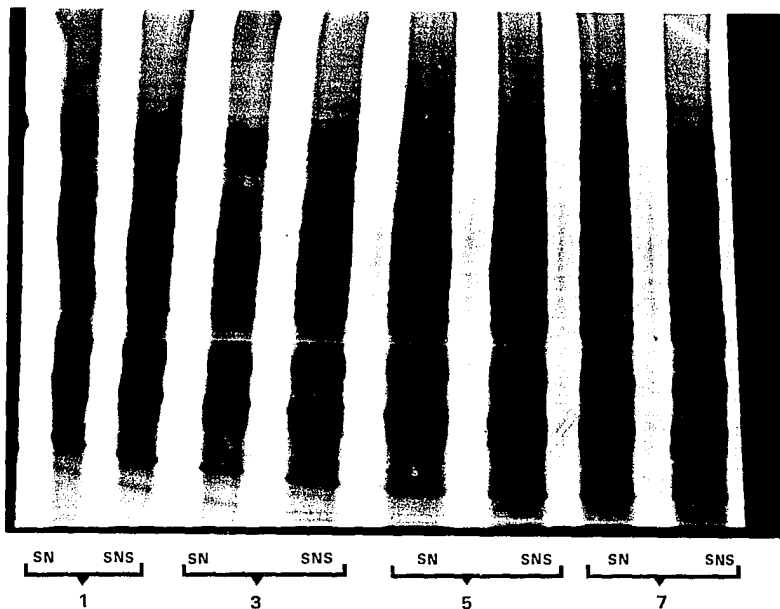


FIGURA 10.- Patrones protéicos de raíz de plantas cultivadas en solución nutritiva (SN) y solución nutritiva con NaCl (SNS) durante 1, 3, 5 y 7 días. La flecha indica la diferencia más notoria entre ambos tratamientos. El gel fue teñido con plata amoniacal.

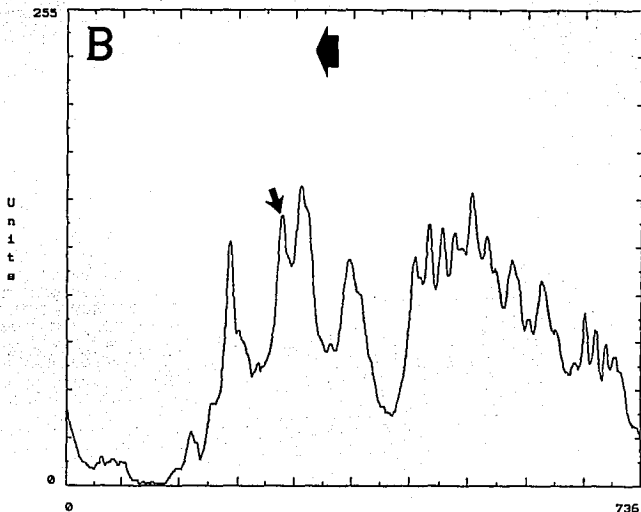
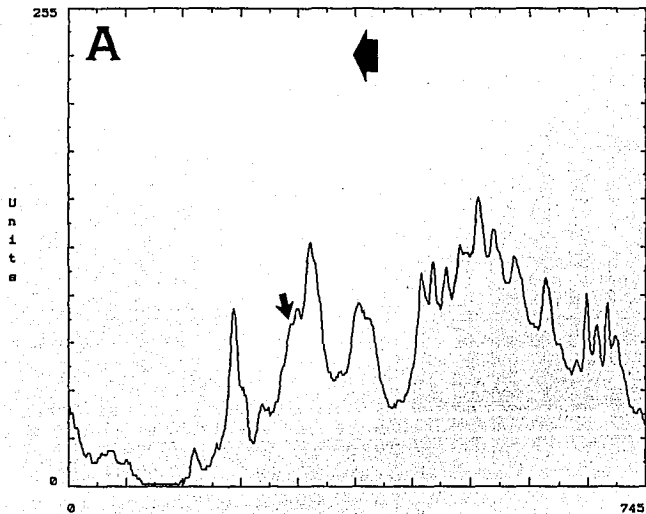


FIGURA 11.- Densitogramas de los patrones protéicos de raíz de plantas cultivadas en solución nutritiva (A) y solución nutritiva con NaCl 100 mM (B) durante 5 días (gel de la figura 10). La flecha horizontal señala la dirección de la corrida y la vertical la diferencia más notable.

El carril 2 de la figura 12 corresponde a proteínas de raíz de plantas expuestas al NaCl desde el momento de la germinación. Esto se hizo para saber si existían diferencias entre los patrones protéicos de este tipo de plantas y los de las expuestas hasta el tercer día de desarrollo. Sin embargo no se encontraron diferencias entre las plantas tratadas de esta forma; P40 se acumula en cantidades similares.

Por otro lado, y haciendo referencia a la osmotina, se ha demostrado que el ácido abscísico (AAB) puede estimular la síntesis del RNAm de dicha proteína, así como llevar a una acumulación de ésta (Bray, 1988 y Singh *et al.*, 1989). Esta hormona (AAB), se incrementa no sólo en hojas, sino también en raíz bajo condiciones de estrés hídrico (Cornish y Zeevaart, 1985) y salino (Kefu *et al.*, 1991), acelerando la adaptación de las células a la sal (Larosa *et al.*, 1985 y 1987). Todos estos estudios permiten suponer que el AAB puede coordinar las respuestas adaptativas de la planta ante el ambiente estresante.

En este trabajo las plantas se trataron, en sus raíces, con una mezcla racémica de AAB 10 μ M, durante 5 días. Los resultados de este experimento se plasman en los carriles 4 y 5 de la figura 12, y en el densitograma "C" de la 13; en ellos se muestra que a pesar de que con este tratamiento existió un incremento en P40, no fue comparable al obtenido con NaCl 100 mM.

En un trabajo reciente (Larosa *et al.*, 1992), se ha confirmado el hecho de que las plantas, como las células en cultivo, acumulan la proteína osmotina y su RNAm cuando se les expone al NaCl. Sin embargo,

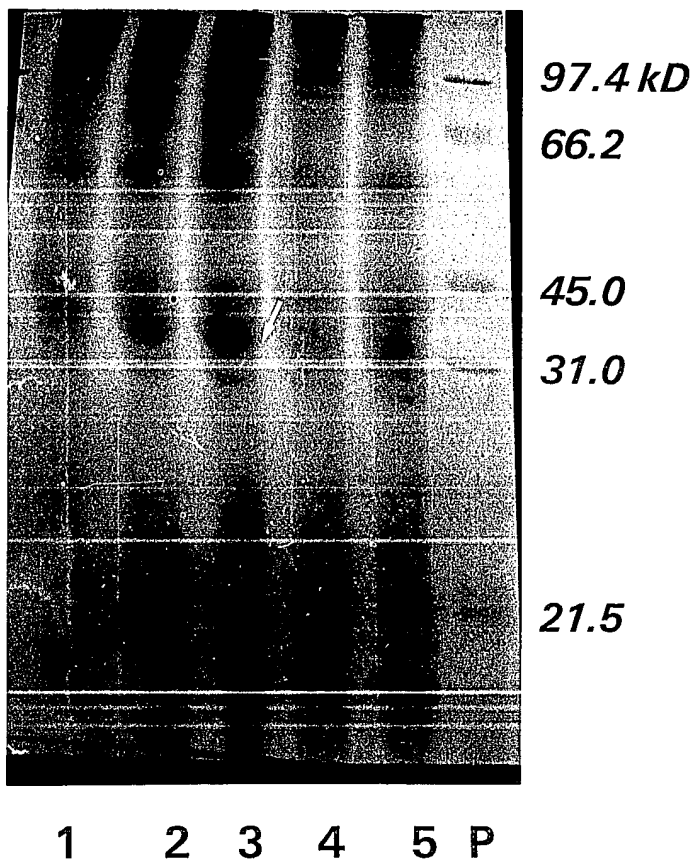


FIGURA 12.- Patrones protéicos de raíz de plántulas cultivadas durante 5 días en solución nutritiva (1), solución nutritiva con NaCl 100 mM (3), y con AAB 10 μ M (4 y 5). El carril 2 corresponde a plantas mantenidas desde la germinación, durante 8 días, en medio salino (100 mM de NaCl). P= Estándares de peso molecular. El gel fue teñido con azul de coomassie.

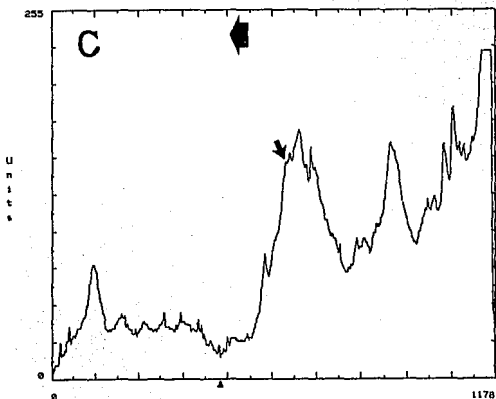
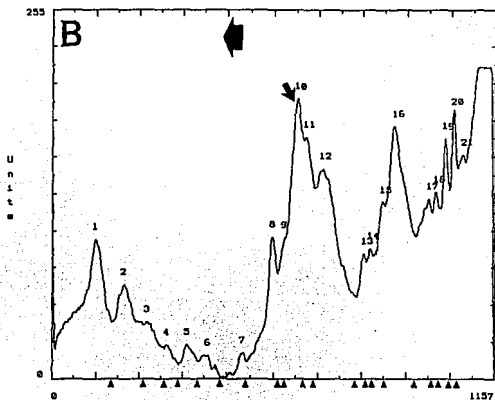
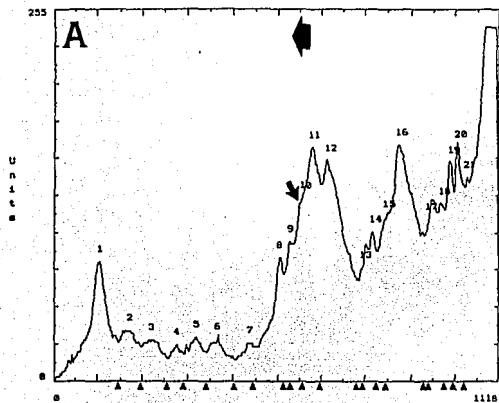


FIGURA 13.- Densitogramas de los carriles 1 (A), 3 (B) y 4 (C) del gel de la figura 12. La flecha horizontal señala la dirección de la corrida y la vertical a P40.

cuando los tejidos vegetales son tratados con AAB, se acumula dicho RNAm, pero la proteína no aparece, o al menos no es detectada con los métodos inmunológicos utilizados por estos autores. Esto apoya la idea de que mientras el AAB induce la síntesis del RNAm, el bajo potencial hídrico, desarrollado durante el estrés salino, permite una traducción preferencial de dicho RNAm (Singh et al., 1989). Esta podría ser también la explicación que se podría dar al hecho de que en la raíz del frijol mungo, el AAB no desarrolla una respuesta similar a la que se da con sal, en cuanto a la expresión de P40.

En otro estudio reciente (Mala et al., 1992), se ha encontrado, en raíces de cebada sometida a un régimen nutricional con bajo contenido de K^+ , un incremento considerable en una proteína de 43 kD, y en menor grado en las de 23, 35, 71 y 81 kD. La proteína de 43 kD pertenece a la fracción enriquecida con tonoplasto y plasmalema. Este péptido fue sintetizado también cuando el K^+ fue reemplazado, en el medio de crecimiento, con una concentración equivalente de Na^+ , pero no sucedió lo mismo cuando el sustituto fue el Rb^+ . De la misma forma, el incremento de P40 en raíz de mungo podría relacionarse con un decremento en el K^+ que, como se mencionó en páginas anteriores, resulta de la presencia de NaCl en el medio de crecimiento.

Considerando lo anterior, y el antecedente en donde se señala que en el frijol mungo una alta concentración de Ca^{++} en el exterior de la raíz atenúa los efectos adversos provocados por la sal, restableciendo los niveles intracelulares del K^+ y con ello un adecuado crecimiento vegetal (Nakamura et al., 1990), se decidió

realizar un experimento en donde la concentración de Ca^{++} se elevaba de 3.5 mM, que es la que se encuentra en la solución nutritiva Hoagland, hasta 10 mM, en presencia de NaCl. Los resultados obtenidos (Figura 14) señalan que en presencia de esta última concentración de Ca^{++} , P40 no se presenta en la misma concentración que aparece cuando sólo existe NaCl en el medio de crecimiento, lo que parece indicar que existe una relación entre el decremento en los niveles de K^+ , provocado por la sal, y el incremento en P40.



FIGURA 14.- Patrones protéicos de raíz de plantas cultivadas durante 5 días en solución nutritiva (A), solución nutritiva + NaCl 100 mM (B) y solución nutritiva + NaCl 100 mM + CaCl₂ 10 mM (C). La flecha señala a P40.

IV.6 SEMIPURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE P40.

Habiéndose demostrado que la proteína denominada P40 se incrementaba con los tratamientos señalados en la sección anterior, se procedió a tratar de obtenerla en forma pura, con la finalidad de conocer algunas de sus características. La metodología utilizada para ello fue descrita en la sección de material y métodos.

Inicialmente se usaron distintas concentraciones de sulfato de amonio con la finalidad de conocer en cual de ellas empezaba a precipitar P40 (Figura 15 A); a partir de estos resultados se decidió utilizar 50 y 85% de dicho compuesto, esto con la intención de descartar, con la primera concentración, un gran número de proteínas que no correspondían a P40, mientras que con 85% se podría obtener esta molécula, junto con un menor número de polipéptidos. En el mismo gel de la figura 15 A, se puede observar que los patrones obtenidos de plantas control (carriles 8 y 9), después de precipitar con 85% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, no presentan cantidades tan altas de P40 como sucede con los de plantas creciendo en 100 mM de NaCl (carriles 6 y 7). El gel de la figura 15 B sirvió para corroborar el peso molecular de P40.

El precipitado obtenido con 85% de sulfato de amonio fue fraccionado en una columna de Sephadex G-200. El perfil de elución obtenido se presenta junto con el azul dextrán en la figura 16. La proteína obtenida en cada uno de estos picos fue tratada con solución desnaturalizante (SDS y mercaptoetanol) y separada en geles de poliacrilamida con SDS, con el objetivo de ver en cual de ellos se encontraba P40. La figura 17 A presenta este gel, teñido con plata.

A

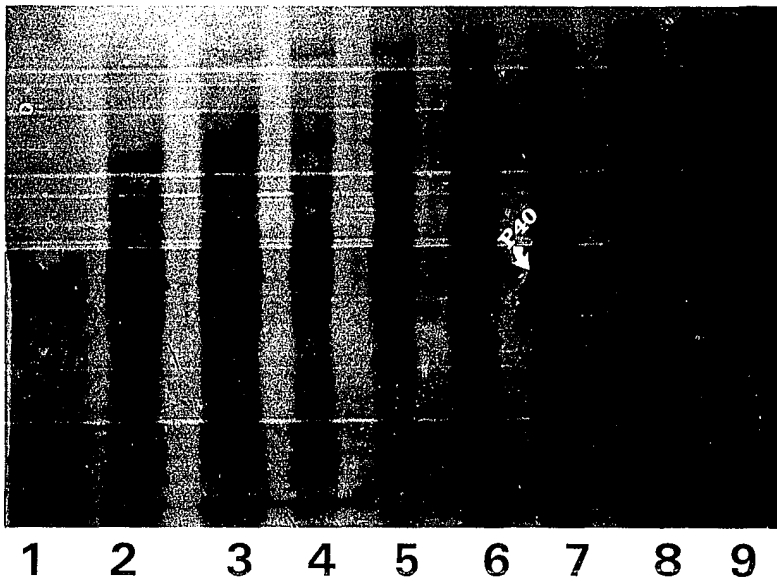


FIGURA 15.- A, patrones de proteínas de raíz de frijol, cultivado durante 5 días bajo un estrés salino (carriles 1 a 7), y en solución Hoagland (carriles 8 y 9), obtenidas por precipitación con sulfato de amonio. 35% (1), 50% (2 y 3), 65% (4 y 5) y 85% de sulfato de amonio (6 a 9). B, estándares de peso molecular (I) y la misma proteína de los carriles 6 y 7 del gel A (II y III).

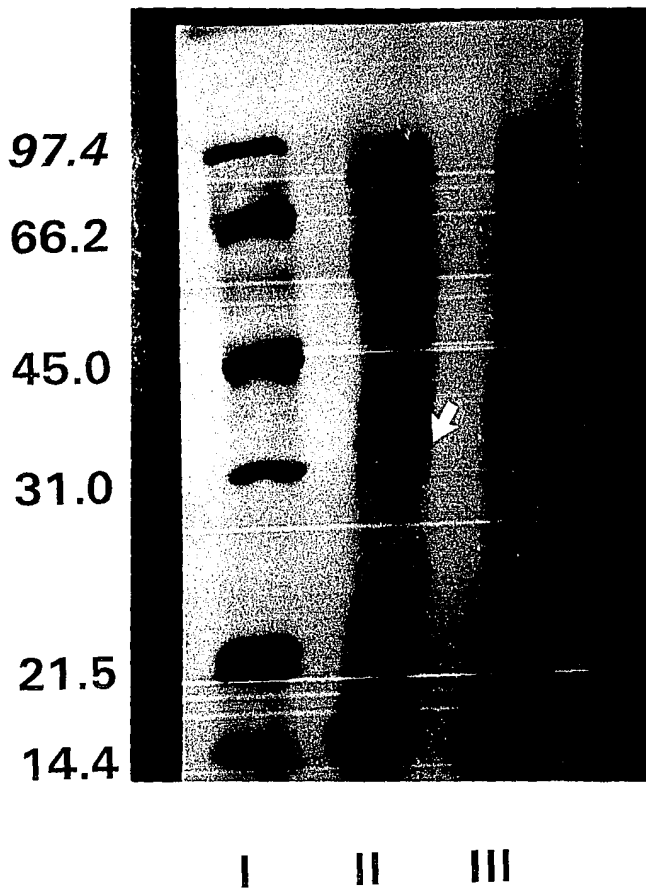


FIGURA 15.- (continúa)

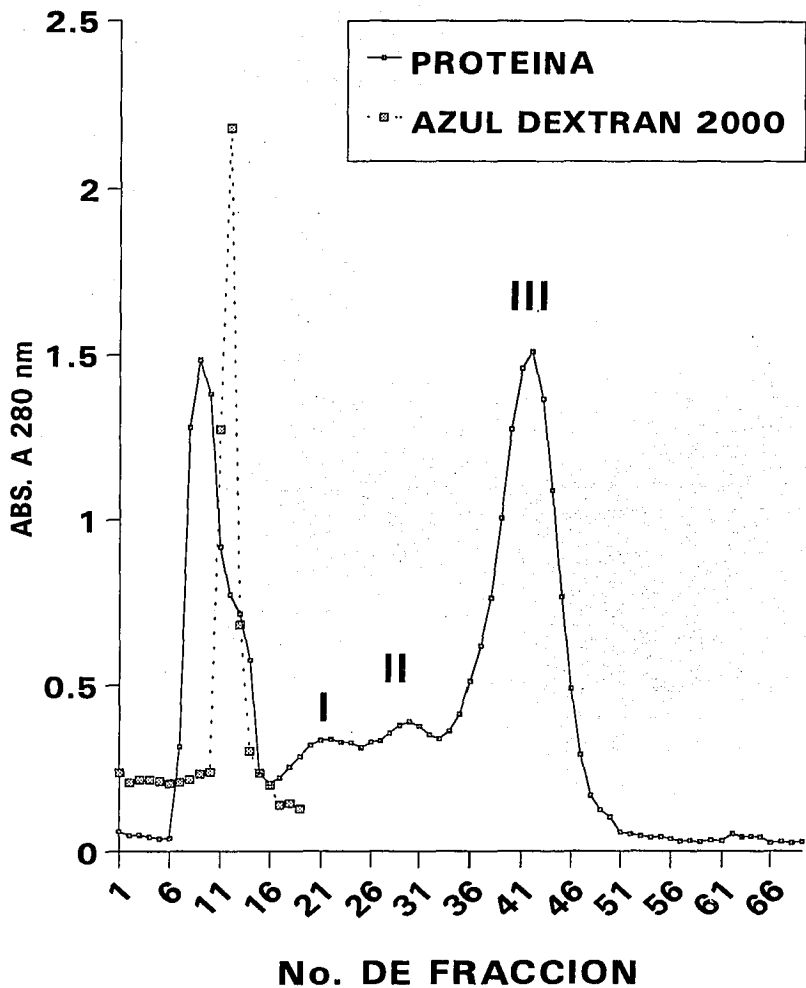


FIGURA 16.- Proteínas y azul dextrán 2000 eluidos de la columna de Sephadex g-200. Cada fracción consistía de aproximadamente 2 ml.

La proteína P40 fue localizada junto con otros polipéptidos en el pico "I", debido a lo cual éste fue corrido en un gel "nativo" (sin SDS) (ver figura 17 B), sin haber sometido la proteína a condiciones desnaturalizantes. Bajo estas condiciones el pico "I" se presentó como una sola proteína, de un peso molecular considerable. Estos resultados permiten decir que P40 forma parte de una proteína oligomérica compuesta por al menos 9 subunidades.

Sobre la posible función de esta molécula, resulta interesante mencionar los siguientes puntos: las proteínas cuya actividad se involucra con el transporte y compartimentalización iónica, procesos importantes en la adaptación a la salinidad, son grandes y multiméricas (Ward et al., 1992); la H⁺-ATPasa de tonoplasto de hipocotilos de maíz, que tiene una masa molecular de aproximadamente 400 kD (Mandala y Taiz, 1986), está también compuesta por 9 subunidades diferentes, con pesos moleculares en el intervalo de 12 a 68 kD; dos polipéptidos de esta misma enzima, pero de hipocotilos de frijol mungo, tienen masas moleculares de 37 y 38 kD (Matsura-Endo et al., 1990), similares a la de P40. La posibilidad de que P40 se relacione con el transporte iónico, modificando o tal vez hasta siendo parte de las H⁺-ATPasas o de transportadores como el H⁺/Na⁺, que son piezas importantes en este proceso, es atractiva. En apoyo a esto, se ha visto que en raíz de cebada, el NaCl presente en el medio de crecimiento induce un incremento en la actividad del transportador Na⁺/H⁺ de tonoplasto (Garbarino y Dupont, 1988), proponiendo estos autores que dicho aumento se debe a la síntesis de una nueva proteína integral de la membrana. Un resultado similar ha

sido reportado para betabel (*Beta vulgaris*) en donde la exposición de la planta a la sal llevó a un incremento en la síntesis de un polipéptido de 170 kD, a la par de que se elevaba la actividad del transportador Na^+/H^+ (Barkla, 1991), sugiriéndose que estos eventos pueden estar asociados con la compartimentalización vacuolar del Na^+ (Katz, 1992).

Refiriéndonos al frijol mungo, recientemente se ha visto que tanto la actividad de la H^+ -ATPasa de plasmalema como de tonoplasto de raíz, se incrementa cuando se presenta un aumento en la concentración de Na^+ en el interior de la planta (Nakamura et al., 1992), sin embargo, hasta ahora no se habían reportado cambios protéicos, para este vegetal, como los que aquí se mencionan.

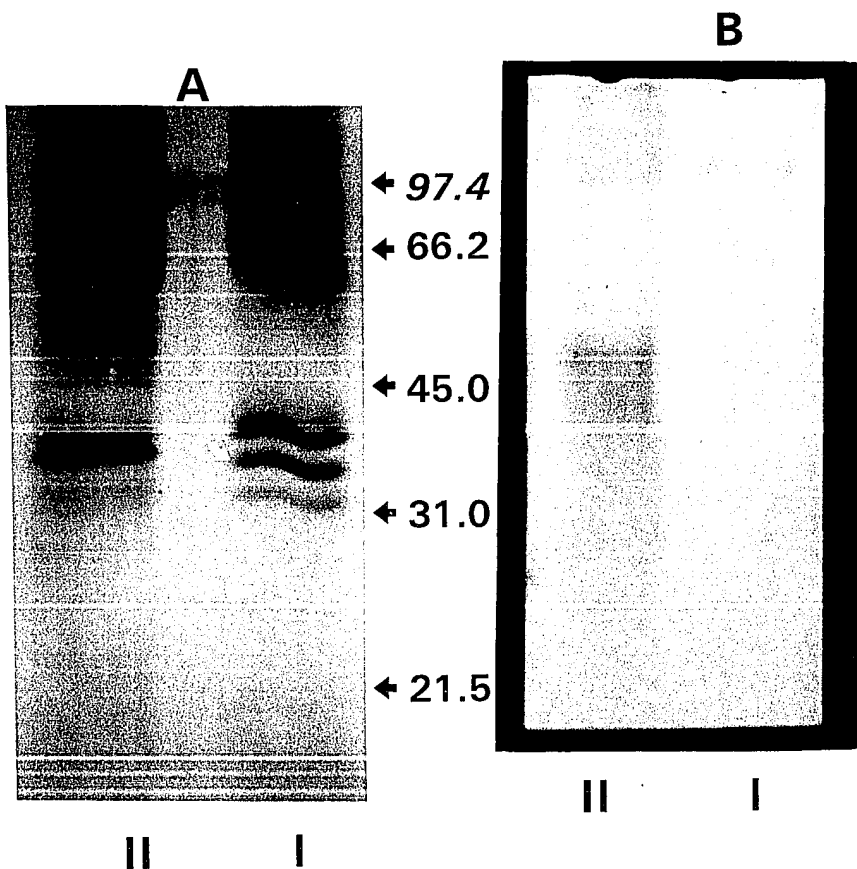


FIGURA 17.- (A), Patrones protéicos de los picos I y II eluidos de la columna de sephadex (ver figura anterior); gel teñido con plata amoniacal. Estas proteínas fueron también corridas en un gel "nativo" (sin SDS) (B). La flecha a la izquierda señala a P40, mientras que las otras la posición de los estándares utilizados.

IV.7 AISLAMIENTO DE VACUOLAS.

Habiéndose observado el aumento en la concentración de P40 y considerando, en base a los antecedentes presentados, que esta molécula puede relacionarse o formar parte del sistema de transporte iónico del tonoplasto, se procedió al aislamiento de la vacuola. Cabe señalar que a pesar de que existe un gran número de técnicas para obtener estos organelos de diversos tejidos (Wagner, 1987 y 1988), se pueden presentar algunas dificultades cuando se intenta su aislamiento en una nueva especie. En especial, las vacuolas de raíz solamente han sido obtenidas de plantas que poseen raíces de almacenamiento (tuberosas), como el rábano, la zanahoria y el betabel (ver Maretzki y Thom, 1989 y Wagner, 1988). Este último vegetal ha sido el más utilizado, aparentemente por la facilidad con la que de él se obtienen dichos organelos (ver Leigh y Branton, 1976).

De lo anteriormente dicho, resulta clara la necesidad que existe de buscar una metodología que permita aislar vacuolas de raíces típicas, como las del frijol mungo, con la finalidad de conocer no sólo lo que al principio de esta sección fue planteado, sino también otras características y eventos de las vacuolas de este tipo de órgano, entre las que se podrían mencionar: cambios en la composición vacuolar, potenciales de membrana, captación y contenido de azúcares e iones, constituyentes vacuolares, características de ATPasas y transportadores, transporte de H^+ , entre otros.

Para cumplir este objetivo se intentó inicialmente aislar estos organelos de raíz de plántulas con 8 días de desarrollo, esto debido a que las demás determinaciones se hicieron en organismos con estas

características. Sin embargo, al principio de la técnica utilizada surgió un problema, básicamente durante el aislamiento de protoplastos, en donde se utilizó una modificación de un método ya descrito (Potrykus y Shillito, 1986); la digestión del tejido con ayuda de enzimas comerciales se dificultó debido a que, aparentemente, la complejidad química de la pared celular dada por celulosas, pectinas y otros polímeros aumenta conforme se avanza en el desarrollo del organismo. Debido a esto, se optó por trabajar con radículas de plantas de 36 h de desarrollo. Los protoplastos obtenidos se muestran en la figura 18 A y B. Cabe aclarar que se intentó realizar un conteo de protoplastos utilizando una cámara de Neubauer, pero desafortunadamente las células resultaron muy frágiles, por lo que al momento en que se colocaba el cubreobjetos éstas se rompían.

La obtención de vacuolas se intentó por dos métodos que inducen la lisis de los protoplastos: por shock osmótico con amortiguador de fosfatos (Wagner y Siegelman, 1975) y con el método de polibase (Boudet et al. 1981). Se utilizó además una técnica que permite el aislamiento de estos organelos directamente del tejido (Blom-Zandstra et al., 1990). Los resultados obtenidos en todos los casos fueron negativos, ya que se obtuvo un rendimiento de vacuolas muy bajo, razón por la cual se intentó con un método distinto. Este consistió en la lisis de los protoplastos con un shock osmótico generado con buffer Tris/HCl, pH 8.0, y la posterior purificación de las vacuolas con ayuda de un gradiente de sacarosa/manitol (ver material y métodos).

Las vacuolas obtenidas así retenían algunos constituyentes citosólicos (Figura 18 D), por lo que se decidió incluir en el medio de lisis el detergente CHAPS, una sulfobetaina derivada del ácido cólico, que se ha demostrado evita esta retención (Match et al., 1987). La presencia de este compuesto tuvo el efecto que se esperaba, sin embargo, también llevó a que el número de organelos purificados disminuyera drásticamente (Figuras 18 E y F).

A partir de las vacuolas obtenidas con y sin detergente se trató de medir la actividad de la ATPasa de tonoplasto, cuantificando el fósforo inorgánico con un método ya descrito (Wharton y McCarty, 1972), así como obtener los patrones proteicos de este organelo (Laemmli, 1970). Desafortunadamente ninguno de estos objetivos pudo lograrse, aparentemente por la baja cantidad de vacuolas que se obtuvieron, a pesar de que, para el caso de los perfiles proteicos, la muestra se concentró previamente con TCA 10% y de que la tinción se realizó con la técnica de plata amoniacal que es, hasta ahora, la más sensible para el revelado de proteínas en gel.

Se ha dicho que las vacuolas poseen de un 5 a un 15% de la proteína del protoplasto (Wagner, 1983) y que en algunas plantas, como es el caso de *Ananas comosus*, el tonoplasto posee solo una pequeña proporción (aprox. 1%) del total de la proteína vacuolar (Kenyon y Black, 1986). Esto podría explicar el por que no se pudo detectar la actividad de ATPasa de tonoplasto, a pesar de que se ha dicho que esta enzima es relativamente abundante en la célula, pues se estima que representa del 4 al 8% del total de proteína del tonoplasto (Randall y Sze, 1987).

Es necesario hacer modificaciones a esta técnica de aislamiento de vacuolas, con el fin de obtener un mayor rendimiento y poder realizar éstas y otras determinaciones. No obstante, la metodología presentada aquí parece ser un buen principio para obtener estos organelos de raíces típicas, de las cuales se tiene poco conocimiento.

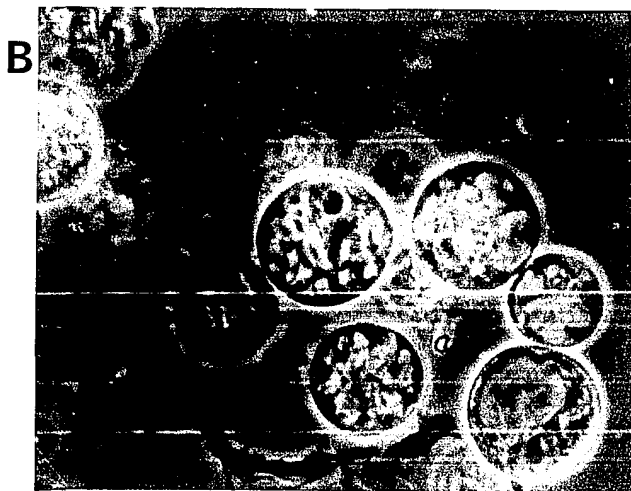
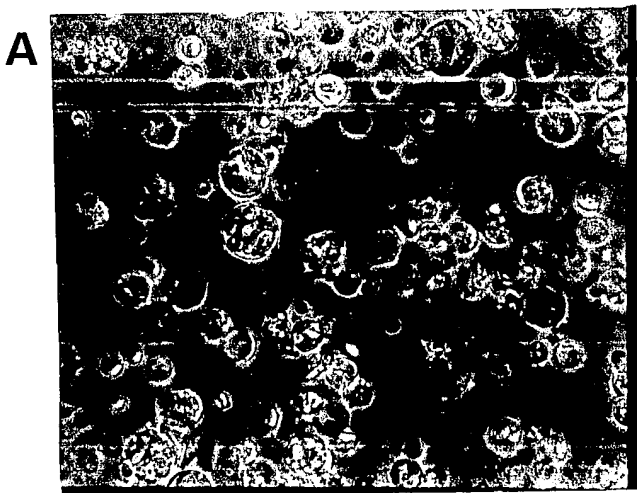


FIGURA 18.- A, protoplastos obtenidos en la interfase manitol/manitol-sacarosa (X 400), B (X 1000); C, vacuolas emergiendo durante el shock osmótico con Tris/HCl (X 1000); D, vacuolas semipurificadas en la fase de manitol 0.6 M (X 400); E, vacuolas semipurificadas en presencia de CHAPS (X 400), F (X 1000). V=vacuola, P=protoplasto C=Constituyentes citosólicos.

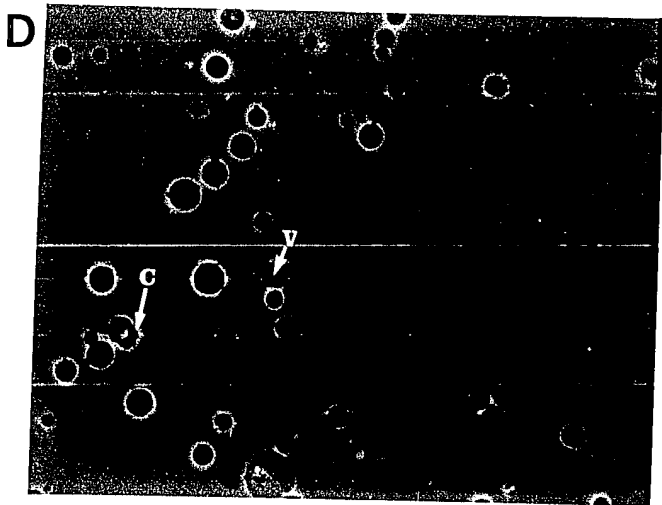
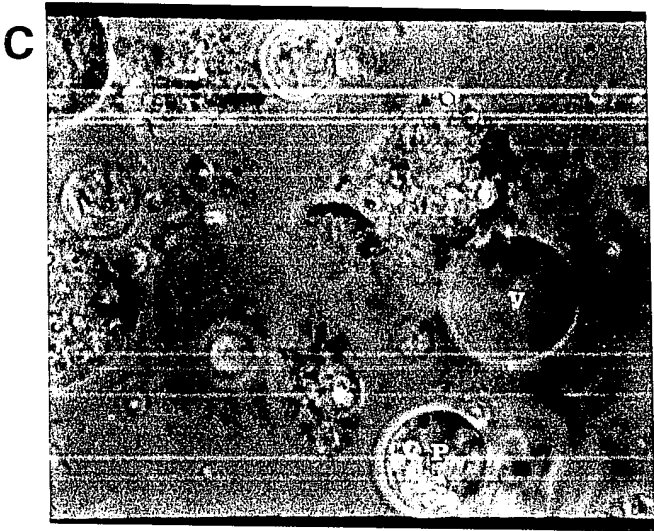
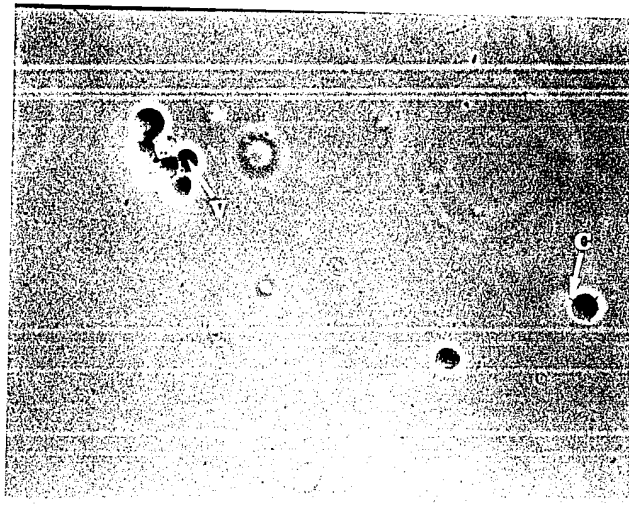


FIGURA 18.- (continúa)

E



F

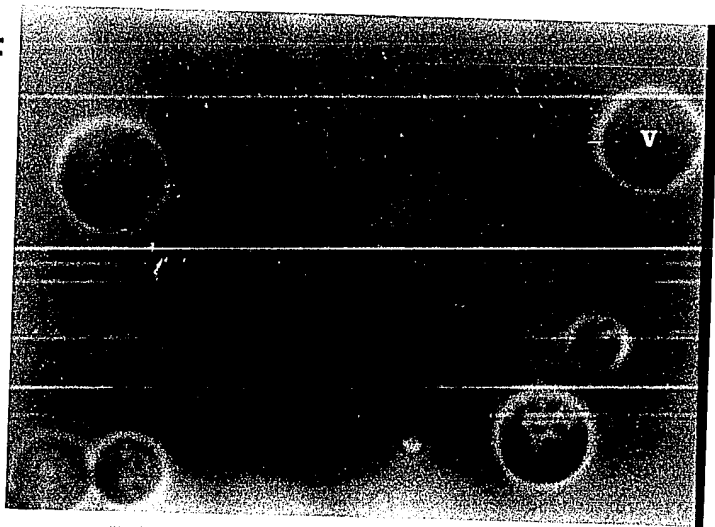


FIGURA 18.- (continúa)

V.-CONCLUSIONES

_El frijol mungo (*Vigna radiata*) puede germinar en una concentración de 150 mM de NaCl en el medio de crecimiento, mientras que en su estadio de plántula (3 a 8 días de desarrollo) resiste hasta 100 mM de dicha sal.

_El efecto más aparente, provocado por el NaCl, es una disminución en la producción de biomasa foliar; el tallo y la raíz prácticamente no presentaron cambios. Esta diferencia podría estar dada por un decremento en la fijación de CO₂ en la hoja, causado por el cierre estomático parcial. Sin embargo, no se puede descartar que esta disminución provenga de un desbalance iónico (en Ca⁺⁺) provocado por la sal.

-La raíz y el tallo tienen la capacidad de tolerar una alta concentración de Na⁺ en su interior, con lo que posiblemente se ajustan osmóticamente para mantener una turgencia propicia para el crecimiento. La hoja, por su parte, parece utilizar al Na⁺ y al K⁺ para llevar a cabo este proceso de osmorregulación.

-El incremento de Mg⁺⁺ encontrado en la raíz de las plantas salinizadas, probablemente se relaciona con el proceso de excreción del Na⁺ o con la compartimentalización vacuolar del mismo.

-El aminoácido prolina se incrementa en todos los órganos de las plantas cultivadas en salinidad. Sin embargo, estos aumentos no son lo suficientemente grandes como para pensar que la prolina puede, por sí sola, realizar un ajuste osmótico celular en el frijol mungo sometido a un estrés con NaCl.

-Una proteína de aproximadamente 40 kD (P40) se incrementa, desde el 5º día de tratamiento, en la raíz de plantas salinizadas. La presencia de AAB (10 μ M), en el medio de crecimiento, también desencadena un aumento en la concentración de P40, aunque no al grado en que lo hace el NaCl (100 mM). Por su parte, el CaCl₂ (10 mM) adicionado a la solución nutritiva conteniendo NaCl 100 mM, previene el incremento que se da en esta proteína cuando está únicamente el NaCl.

-P40 forma parte de una proteína oligomérica compuesta por al menos 9 subunidades, susceptible de ser purificada utilizando precipitación con sulfato de amonio (85% de saturación), después de haber descartado la pastilla obtenida con 50% de sulfato y antes de dializar, fraccionando finalmente en una columna de Sephadex G-200.

-La metodología utilizada para el aislamiento de vacuolas de raíz de frijol mungo (raíces típicas), permite obtener estos organelos en forma aparentemente pura; sin embargo, el rendimiento obtenido es bajo, por lo que es necesario hacer algunas modificaciones a la técnica.

R E F E R E N C I A S

- Ashraf, M. y Rasul, E. 1988. Salt tolerance of mung bean (*Vigna radiata* (L) Wilsek) at two growth stages. *Plant and Soil* 110: 67-37.
- Aspinall, D. y Paleg, G. L. 1981. Proline accumulation: physiological aspects. En: Paleg, L. y Aspinall, D. (eds.). *Physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. Academic Press. Pags.: 205-259.
- Binzel, et al. 1988. Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiol.* 86: 607-614.
- Barkla, B. J. y Blumwald, E. 1991. Identification of a 170-kDa protein associated with the vacuolar Na^+/H^+ antiport of *Beta vulgaris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 113-125.
- Binzel, M. L. et al. 1987. Solute accumulation in tobacco cells adapted to NaCl. *Plant Physiol.* 84: 1408-1415.
- Blom-Zandstra, M. et al. 1990. Direct isolation of vacuoles from leaf tissue of lettuce (*Lactuca sativa*) retraining protoplasts within the leaves. *Physiol. Plant.* 79: 693-699.
- Blumwald, E. 1987. Tonoplast vesicles as a tool in the study of ion transport at the plant vacuole. *Physiol. Plantarum* 69: 731-734.
- Boudet, A. M. et al. 1981. Isolation and characterization of vacuoles from *Melilotus alba* mesophyll. *Plant Physiol.* 68: 1354-1358.
- Bray, E. A. 1988. Drought- and ABA-induced changes in polypeptide and mRNA accumulation in tomato leaves. *Plant Physiol.* 88: 1210-1214.
- Briens, M. et al. 1982. Osmoregulation in halophytic higher plants: a comparative study of soluble carbohydrates, polyols, betaines and free proline. *Plant, cell and environment* 5: 287-292.
- Cajuste, L. J. 1977. Química de suelos con un enfoque agrícola. Talleres graficos de la nación, Mexico. Pags. 131-132.
- Casas, A. M. et al. 1992. Expression of osmotin-like genes in the halophyte *Atriplex nummularia* L. *Plant Physiol.* 99: 329-337.
- Chandler, S. F. y Thorpe, T. A. 1987. Characterization of growth, water relations, and proline accumulation in sodium sulfate tolerant callus of *Brassica napus* L. cv Westar (Canola) *Plant Physiol.* 84: 106-111.
- Christiansen, M. N. y Lewis, CH. L. 1987. Mejoramiento de plantas en ambientes poco favorables. Limusa, Mexico. Pags. 9-21 y 173-210.

Clarkson, D. T. y Hanson, J. B. 1980. The mineral nutrition of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 239-298.

Cornish, K. y Zeevaart, J. A. D. 1985. Abscisic acid accumulation by roots of *Xanthium strumarium* L. and *Lycopersicon esculentum* Mill. in relation to water stress. *Plant. Physiol.* 79: 653-658.

Cortes, B. J. 1985. Determinación de las condiciones de salinidad y drenaje en un área experimental localizada en el ejido de Parras, Coahuila. *Terra* 3(2): 190-196.

Cramer, G. R. et al. 1985. Displacement of Ca^{++} by Na^{+} from plasmalemma of root cells. *Plant Physiol.* 79: 207-211.

Cramer, G. R. et al. 1986. Effects of NaCl and CaCl on ion activities in complex nutrient solutions and root growth of cotton. *Plant Physiol.* 81: 792-797.

Duffus, C. y Slaughter, C. 1992. Las semillas y sus usos. AGT editor, México. 189 pags.

Dunn, A. y Arditti, J. 1968. *Experimental physiology*. Holt, Rinehart and Winston, Nueva York. 265 pags.

Epstein, E. 1972. *Mineral nutrition of plants: principles and perspectives*. John Wiley and Sons Inc. Nueva York.

Epstein, E. 1976. Genetics potentials for solving problems of soil mineral stress: Adaptation to crops to salinity. En: Writh, M. J. (ed.). *Plant adaptation to mineral stress in problem soils*. Cornell University, USA. pags.: 73-82.

Epstein, E. et al. 1979. Production of food crops and other biomass by seawater culture. En: Hollander, A. (ed.). *The biosaline concept: an approach to the utilization of underexploited resources*. Plenum Press, Nueva York. Pags. 77-99.

Ericson, M. C. y Alfinito, S. H. 1984. Proteins produced during salt stress in tobacco cell culture. *Plant Physiol.* 74: 506-509.

Felger, R. y Moser, M. B. 1973. Eelgrass (*Zostera marina* L) in the Gulf of California: discovery of its nutritional value by the Seri Indians. *Science* 181: 355-356.

Fernandez, G. R. 1990. Algunas experiencias y proposiciones sobre recuperacion de suelos con problemas de sales en Mexico. *Terra* 8 (2): 226-240.

Flowers, T. J. et al. 1976. Salt tolerance in the halophyte *Suaeda maritima*: Some properties of malate dehydrogenase. *Trans. R. Soc. Lond. B.* 273: 523-540.

Flowers, T. J. et al. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28: 89-121.

Garbarino, J. y DuPont, F. M. 1988. NaCl induces a Na^+/H^+ antiport in tonoplast vesicles from barley roots. *Plant Physiol.* 86: 231-236.

Greenway, H. y Osmond, C. B. 1972. Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance. *Plant Physiol.* 49: 256-259.

Greenway, H. y Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 31: 149-190.

Hanson, A. D. y Nilsen, C. E. 1978. Betaine accumulation and [^{14}C]formate metabolism in water-stressed barley leaves. *Plant Physiol.* 62: 305-312.

Hellebust, J. A. 1976. Osmoregulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27: 485-505.

Horst, M. 1990. Mineral nutrition of Higher plants. 4a. ed., Academic Press, Londres. 674 pags.

Huang, A. H. C. y Cavalleri, A. J. 1979. Proline oxidase and water stress-induced proline accumulation in spinach leaves. *Plant Physiol.* 63: 531-535.

Hurkman, W. J. y Takana, C. K. 1987. The effects of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots. *Plant Physiol.* 83: 517-524.

Hartmann, H. T. y Kester, D. E. 1986. Propagación de plantas: principios y practicas. 6a. ed., Cecsa, México. 814 pags.

Imamul Huk, S. M. y Larher, F. 1983. Osmoregulation in higher plants: effects of NaCl salinity on non-nodulated *Phaseolus aureus* L. I. Growth and mineral content. *New Phytol.* 93: 203-208.

Jacoby, B. 1964. Function of bean roots and stems in sodium retention. *Plant Physiol.* 445-449.

Jensen, P. 1982. Efeccts of interrupted K^+ supply on growth and uptake of K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} y Na^+ in spring weath. *Physiol. Plant.* 56: 259-265.

Jeschke, W. D. y Nassery, H. 1981. K^+/Na^+ selectivity in roots of Triticum, Heliantus and Allium. *Physiol. Plant.* 52: 217-224.

Jeschke, W. D. 1984. K^+/Na^+ exchange at cellular membranes, intracellular compartmentation of cations, and salt tolerance. En: Staples, R. C. y Toenniessen, G. H. (eds.). Salinity tolerance in plants. John Wiley and Sons, Nueva York. Pags. 37-65.

Kasamo, K. y Nouchi I. 1987. The role of phospholipids in plasma membrane ATPase activity in *Vigna radiata* L. (Mung Bean) roots and hypocotyls. *Plant Physiol.* 83: 323-328.

Katz, A. et al. 1992. Modulation of Na⁺/H⁺ antiporter activity by extreme pH and salt in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 100: 1224-1229.

Kefu, Z. K. et al. 1991. Abscisic acid levels in NaCl-treated barley, cotton and saltbush. *Aust. J. Plant Physiol.* 18: 17-24.

Kenyon, W. H. y Black, C. C. 1986. Electrophoretic analysis of protoplast, vacuole, and tonoplast vesicle proteins in crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiol.* 82: 916-924.

King, G. J. et al. 1986. A protein induced by NaCl in suspension cultures of *Nicotiana tabacum* accumulates in whole plant roots. *Plant Mol. Biol.* 7: 441-449.

Knoth, A. y Wiencke, C. 1984. Dynamic changes of protoplasmic volume and of fine structure during osmotic adaptation in the intertidal red alga *Porphyra umbilicalis*. *Plant, Cell and Environment* 7: 133-139.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.

LaRosa, P. C. et al. 1985. Abscisic acid accelerates adaptation of cultured tobacco cells to salt. *Plant Physiol.* 79: 138-142.

LaRosa, P. C. et al. 1987. Abscisic acid stimulated osmotic adjustment and its involvement in adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.* 85: 174-181.

LaRosa, P. C. et al. 1992. Osmotin gene expression is posttranscriptionally regulated. *Plant Physiol.* 100: 409-415.

Lauchli, A. 1984. Salt exclusion: an adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. En: Staples, R. C. y Toenniessen, G. H. (eds.). *Salinity tolerance in plants*. John Wiley and Sons, Nueva York. pags. 171-187.

Leigh, R. A. y Branton, D. 1976. Isolation of vacuoles from root storage tissue of *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol.* 58: 656-662.

Lessani, H. y Marchsner, H. 1978. Relation between salt tolerance and long-distance transport of sodium and chloride in various crop species. *Aust. J. Plant Physiol.* 5: 27-37.

Le Rudulier, D. y Valentine, R. C. 1982. Genetic engineering in agriculture: osmoregulation. *TIBS* 7: 431-433.

Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol. 2. Academic Press, USA. 607 pags.

Lowry, O. H. et al. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265.

Ludewig, M. et al. 1988. Abscisic acid and water transport in sunflowers. Planta 175: 325-333.

Lynch, J. et al. 1987. Salinity reduces membrane-associated calcium in corn root protoplasts. Plant Physiol. 83: 390-394.

Lynch, J. y Lauchli, A. 1988. Salinity affects intracellular calcium in corn root protoplasts. Plant Physiol. 87: 351-356.

Mala, F. et al. 1992. De novo synthesis of plasma membrane and tonoplast polypeptides of barley roots during short-term K⁺ deprivation. Plant Physiol. 100: 1269-1276.

Mandala, S. y Taiz, L. 1986. Characterization of the subunit structure of the maize tonoplast ATPase. J. Biol. Chem. 261: 12850-12855.

Maretzky, A. y Thom, M. 1989. Vacuoles: isolation, purification, and uses. En: Bajaj, Y. P. S. (ed.). Plant protoplasts and genetic engineering. Springer-Verlag, Berlin. 459-479.

Match, T. et al. 1987. Sodium, potassium, chloride, and betaine concentrations in isolated vacuoles from salt-grown *Atriplex gmelini* leaves. Plant Physiol. 84: 173-177.

Matsuura-Endo, C. 1990. Subunit composition of vacuolar membrane H⁺-ATPase from mung bean. Eur. J. Biochem. 187: 745-751.

Meiri, A. y Poljakoff-Mayber, A. 1970. Effect of various salinity regimes on growth, leaf expansion and transpiration rate of bean plants. Soil sci. 109: 26-34.

Moftah, A. E. y Burlyn, E. M. 1987. The effect of sodium chloride on solute potential and proline accumulation in soybean leaves. Plant Physiol. 83: 238-240.

Nakamura, Y. et al. 1990. Protective effect of external Ca⁺⁺ on elongation and the intracellular concentration of K⁺ in intact mung bean roots under high NaCl stress. Plant Cell Physiol. 31(6): 815-821.

Nakamura, Y. et al. 1992. Stimulation of the extrusion of protons and H⁺-ATPase activities with the decline in pyrophosphatase activity of tonoplast in intact mung bean roots under high-NaCl stress and its relation to external levels of Ca⁺⁺ ions. Plant Cell Physiol. 33(2):

Neumann, P. M. et al. 1988. Salinity stress inhibits bean leaf expansion by reducing turgor, not wall extensibility. *Plant Physiol.* 88: 233-237.

Oakley, B. R., et al. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 105: 365-363.

Patel, K. et al. 1988. Detection of proteins in polyacrylamide gels using an ultrasensitive silver staining technique. En: Walker, J. M. (ed.). *Methods in molecular biology, vol. 3: New protein techniques.* Humana Press, USA. Pags.: 159-168.

Pye Unicam Ltd., 1975. Atomic absorption spectrophotometry with the Pye Unicam SP 1900 and SP190 Series instruments. Inglaterra. s. p.

Pitman, M. G. et al. 1981. Ion distribution in roots of barley seedlings measured by electron probe X-ray microanalysis. *Plant Physiol.* 68: 673-679.

Pollard, A. y Wyn Jones, R. G. 1979. Enzyme activities in concentrated solutions of glicinbetaine and other solutes. *Planta* 144: 291-298.

Potrykus, I. y Shillito, R. D. 1986. Protoplast isolation, culture, plant regeneration. En: Weissbach, A. y Weissbach, H. (eds.). *Methods in Enzymology, Vol. 118: Plant molecular biology.* Academic Press, USA. Pags.: 549-578.

Rains, D. W. 1979. Salt tolerance of plants: strategies of biological systems. En: Hollander, A. (ed.). *The biosaline concept.* Plenum Press, Nueva York. Pags. 47-67.

Randall, S. K. y Sze, H. 1987. Purification and characterization of the tonoplast H^+ -translocating ATPase. En: Packer, L. y Douce, R. (eds.). *Methods in enzymology: plant cell membranes.* Academic Press, USA. 148: 123-132.

Rengel, Z. 1992. The role of calcium in salt toxicity. *Plant, Cell and Environment* 15: 625-632.

Reuveni, M. et al. 1990. Enhanced H^+ transport capacity and ATP hydrolysis activity of the tonoplast H^+ -ATPase after NaCl adaptation. *Plant Physiol.* 94: 524-530.

Rhodes, D. 1987. Metabolic responses to stress. En: Stumpf, P. K y Conn, E. E. (eds.). *The biochemistry of plants.* 12: 201-241.

Rush, D. W. y Epstein, E. 1976. Genotypic responses to salinity

differences between salt-sensitive and salt-tolerant genotypes of tomato. *Plant Physiol.* 57: 162-166.

Sanchez-Aguayo, I. et al. 1991. Cytochemical localization of ATPase activity in salt-treated and salt-free grown *Lycopersicon esculentum* roots. *Plant Physiol.* 96: 153-158.

Salim, M. y Pitman, M. G. 1988. Salinity tolerance of mung bean (*Vigna radiata* L.): seed production. *Biol. Plant.* 30: 53-57.

Shu-Mei, P. et al. 1981. Betaine accumulation and betaine-aldehyde dehydrogenase in spinach leaves. *Plant Physiol.* 67: 1105-1108.

Singh, N. K. et al. 1973. Stress metabolism. I. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress. *Aust. J. Biol. Sci.* 26: 45-56.

Singh, N. K. et al. 1985. Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.* 79: 126-137.

Singh, N. K. et al. 1987. Characterization of osmotin. *Plant Physiol.* 85: 529-536.

Singh, N. K. et al. 1987a. Hormonal regulation of protein synthesis associated with salt tolerance in plant cells. *Pro. Natl. Acad. Sci.* 84: 739-743.

Singh, N. K. et al. 1989. Molecular cloning of osmotin and regulation of its expression by ABA and adaptation to low water potential. *Plant Physiol.* 90: 1096-1101.

Somers, G. F. 1979. Production of food plants in areas supplied with high saline water: problems and prospects. En: Mussell, H. y Staples, R. C. (eds.) John Wiley and Sons, USA. pags.: 107-142.

Staal, M. et al. 1991. Na^+/H^+ antiport activity in tonoplast vesicles from roots of the salt tolerant *Plantago maritima* and the salt-sensitive *Plantago media*. *Physiol. Plant.* 82: 179-184.

Staples, R. C. y Toennessen, G. H. 1984. Salinity tolerance in plants: strategies for crop improvement. John Wiley and Sons, USA. 443 pags.

Stewart, G. R. y Larher, F. 1980. Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress. En: The biochemistry of plants, Vol. 5. Academic Press. Nueva York. Pags.: 609-635.

Storey, R. y Wyn Jones, R. G. 1977. Quaternary ammonium compounds in plants in relation to salt resistance. *Phytochem.* 16: 447-453.

- Stumpf, D. K. 1984. Quantitation and purification of quaternary ammonium compounds from halophyte tissue. *Plant Physiol.* 75: 73-274.
- Sze, H. 1985. H⁺-Translocating ATPases: advances using membrane vesicles. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 175-208.
- Tamhane, R. V. 1983. Suelos: su química y fertilidad en zonas tropicales. 3a. ed., Diana, Mexico. Pag. 216.
- Thomson, W. W., et al. 1988. Salt glands. En: Baker, D. A. y Hall, J. L. (eds.). *Solute transport in plant cells and tissues*. Longman, Gran Bretaña. Pags.: 498-537.
- Wagner, G. J. y Siegelman, H. W. 1975. Large-scale isolation of intact vacuoles and isolation of chloroplasts from protoplasts of mature plant tissues. *Science* 190: 1298-1299.
- Wagner, G. J. 1983. Higher plant vacuoles and tonoplasts. En: Hall, J. L. y Moore, A. L. *Isolation of membranes and organelles from plant cells*. Academic Press, USA. Pags.: 83-118.
- Wagner, G. J. 1987. Isolation of mature vacuoles of higher plants: General principles, criteria for purity and integrity. En: Packer, L. y Douce, R. (eds.). *Methods in Enzymology*, Vol. 148: *Plant Cell Membranes*. Academic Press, USA. Pags.: 55-74.
- Wagner, G. J. 1988. Higher plant vacuoles and tonoplasts. En: Hall, J. L. y Moore, A. L. (eds.). *Isolation of membranes and organelles from plant cells*, 3a. ed. Academic Press, USA. Pags.: 83-118.
- Ward, J. M. et al. 1992. Dissociation and reassembly of the vacuolar H⁺-ATPase complex from oat roots. *Plant Physiol.* 99: 61-169.
- Wharton, D. C. y McCarty, R. E. 1972. *Experiments and methods in biochemistry*. McMillan Pub. Nueva York.
- Wyn, J. y Storey, R. 1981. Betaines. En: Paleg, L. y Aspinall, D. (eds.). *Physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. Academic Press. Pags.: 171-204.
- Yeo, A. R. 1983. Salinity resistance: physiologies and prices. *Physiol. Plant.* 58: 214-222.