

31967



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

IZTACALA

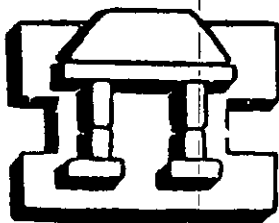
Efecto del estrés salino sobre los eventos
primarios de la fotosíntesis en
Triticum aestivum L.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRO EN BIOLOGIA DE
RECURSOS VEGETALES

P R E S E N T A :

BIOLOGO HUGO V. ^{Argüello} PERALES VELA



IZTACALA

Director de Tesis:
Dr. Sergio González Moreno

Los Reyes Iztacala, 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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







DEDICATORIA:




- ✓ A quien es digno de honra y gloria, a ti Señor Jesucristo, gracias por salvarme, no sería nada de lo que soy si no fuera por tu gracia y por tu amor. Gracias por dar la vida por mi.
- ✓ A mi esposa Angélica, por pagar el costo de éste trabajo con amor y paciencia.
- ✓ A mis Padres, Hugo y Yolanda Perales Vela y Raúl y Angélica Carrillo Rubio, el trabajo de éstos años no hubiera sido posible sin su amor y apoyo.
- ✓ A mis hijos David Asaf, Isaí Jonatán y Keila Angélica, mi herencia en Dios, esto es para ustedes hijos.
- ✓ A mis hermanas Olga, Susana, Rebeca y Nora Perales Vela y David, Minerva y Beis Carrillo Rubio, gracias por estar conmigo, por su apoyo, sus cuidados a mis hijos, por su amor de hermanos.
- ✓ A la Maestra en Piano Edith Ruiz Zepeda (Ditzzy) gracias por tus oraciones, por el ánimo, por revisar la ortografía y redacción del trabajo que mucho lo necesitaba.
- ✓ A la Congregación IMMAR, Monte Sinaí en Cd. Satélite, por sus cuidados en éstos años, no quisiera omitir a nadie, gracias a todos.

AGRADECIMIENTOS

- ✓ A mis profesores Dr. Sergio González y M. en C. Martha Salcedo que han sido como padres para mi durante éstos últimos 13 años, por todos sus consejos más allá de lo académico.
- ✓ A mi profesor y compañero de trabajo Biol. Manuel Mandujano, por su amistad, por el cuidado para un alumno muy descuidado.
- ✓ A Dr. Roberto Velasco, por las revisiones y sugerencias a éste proyecto, por su amistad y apoyo
- ✓ A mis profesores Dr. Ignacio Peñalosa, M. en C. Alberto Arriga y M. en C. Ernesto Aguirre por su amistad y apoyo. Gracias por revisar el trabajo.
- ✓ A los profesores M. en C. Socorro Sánchez y M. en C. Pablo Ruiz por su apoyo en la jefatura del área durante éste año de sabático.
- ✓ Los estudios de Maestría fueron apoyados por una beca de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM.
- ✓ El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Morfofisiología y Función de la Facultad de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM.

CONTENIDO:

	CONTENIDO	1
	ABREVIATURAS	3
	RESUMEN	5
	INTRODUCCIÓN	6
I	Efectos fisiológicos	9
A	Estrés hídrico	9
B	Desbalance nutricional	10
C	Desbalance energético	11
II	Mecanismos de Tolerancia	13
III	Productividad en relación a la salinidad	14
A	Reducción en la fotosíntesis	15
	ANTECEDENTES	17
I	Efectos de la salinidad en la fotosíntesis	17
A	Expansión foliar y estructura foliar	17
B	Cambios estructurales: pigmentos y complejos	19
C	Conductancia estomática y fijación de CO ₂	23
D	Transporte electrónico	25
E	Fijación de CO ₂ : Actividad enzimática	27
F	Niveles iónicos intracloroplásticos	29
II	Regulación de la absorción lumínica	31
III	Mecanismos de regulación de la energía de excitación fotosintética	34
IV	Tolerancia a la salinidad en la tribu Triticeae	43
	METODOLOGIA	46
I	Material Vegetal	46
II	Condiciones de crecimiento	46
A	Crecimiento	46
B	Tratamientos	47
III	Tamaño de la muestra y diseño experimental	47
IV	Análisis de crecimiento	48
A	Germinación	48
B	Análisis del desarrollo	49
C	Análisis iónico	49
V	Análisis de la fluorescencia	50
A	Eficiencia fotoquímica de PSII	50
B	Tamaño relativo de QA y PQ	52
C	Análisis del decaimiento de la fluorescencia in vivo	54
VI	Transporte de electrones en hoja	56
A	Velocidad de separación de cargas en PSII	56
B	Transporte electrónico en tilacoide aislado	58

VII	Liberación de oxígeno	60
VIII	Cuantificación de clorofila	61
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
I	Efectos en el crecimiento	64
A	Germinación	64
B	Desarrollo vegetativo	68
1	Crecimiento del vástago	68
2	Crecimiento radicular	71
3	Crecimiento foliar	73
II	Efectos en el contenido iónico	76
A	Distribución catiónica	76
1	Contenido catiónico en raíz	79
2	Contenido catiónico en vástago	89
3	Contenido catiónico en tallo	91
4	Contenido catiónico en hoja	92
III	Efectos en los procesos primarios de la fotosíntesis	104
A	Efectos en la concentración de clorofila	108
B	Efectos sobre la eficiencia fotoquímica de PSII (Fv/Fm)	116
C	Efecto sobre las variables de trabajo fotoquímico (qP) y trabajo no fotoquímico (qNP)	122
D	Efecto sobre el acarreo de electrones en PSII	125
E	Tamaño relativo de Qa y Plastoquinona	132
F	Efecto sobre la liberación de oxígeno	137
	CONCLUSIÓN	146
	BIBLIOGRAFÍA	147

Lista de Abreviaturas:

CO₂	Bióxido de carbono
RubisCO	Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa
ATP	Adenosin trifosfato
ADP	Adenosin difosfato
NADP⁺	Nicotin adenin dinucleotido fosfato oxidado
NADPH	Nicotin adenin dinucleotido fosfato reducido
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
(A)	Tasa de asimilación de bióxido de carbono
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
QA	Quinona A
QB	Quinona B
PQ	Plastoquinona
Cit b/f	Citocromo b/f
ATPasa	Complejo ATP sintetasa
PC	Plastocianina
DCPIP	Dlicoroindofenol
DCMU	(3,4-diclorofenil)-1,1 dimetilurea
MV	Metil Viologeno
DAD	Fenilamina
LAR	Tasa de incremento de área foliar
NAR	Tasa de asimilación neta
RGR	Tasa de crecimiento relativo
Pi	Fosfato inorgánico (ortofosfato)
Kd	Kilodaltones
qP	Liberación de energía por trabajo fotoquímico
qNP	Liberación de energía por trabajo no-fotoquímico
Fo	Fluorescencia mínima
Fm	Fluorescencia máxima
Fv	Fluorescencia variable
Fv/Fm	Rendimiento fotoquímico para el fotosistema II
Φ_{II}	Transporte electrónico no cíclico
K	Potasio
Mg⁺⁺	Magnesio
Ca⁺⁺	Calcio
DDF	Densidad de flujo fotónico
Fs	Fluorescencia en estado estacionario
LCH	Complejo antena
Kp	Liberación de energía de excitación por trabajo fotoquímico
Kd	Liberación de energía de excitación por calor
Kt	Liberación de energía de excitación por cambios de estado

Kf	Liberación de energía de excitación por transferencia a sistemas no fluorescentes "spill over"
RCII	Centro de reacción del fotosistema II
ABA	Ácido abscísico
Ci	Bióxido de carbono interno
1-qP	Presión de reducción sobre la Quinona A
nm	Nanometros
O₂	Oxígeno molecular

RESUMEN:

La salinidad es uno de los problemas edáficos que más afecta la productividad agrícola del mundo. La actividad fotosintética depende de una coordinada regulación entre los procesos de absorción de energía de excitación, la transformación de ésta en energía química, la fijación de bióxido de carbono y la síntesis y uso de los fotosintetatos. Es ampliamente reconocido que la salinidad afecta el proceso fotosintético. El objetivo de este trabajo fue describir los mecanismos de regulación de la energía de excitación cuando la planta se encuentra en estrés salino. Semillas de *Triticum aestivum* L. fueron sembradas en agrolita, agregando solución nutritiva Hoagland (control) y 75 y 150 mM (experimentales). A los 28 días de tratamiento se cuantificó el crecimiento de la planta, la acumulación de iones en cada tejido y la concentración de clorofilas en las hojas. Por emisión de fluorescencia a temperatura ambiente se midió la eficiencia fotoquímica de PSII, la liberación de energía por procesos fotoquímicos y no fotoquímicos, el acarreo electrónico y el tamaño relativo del pool de quinonas A y plastoquinonas. Polarográficamente se midió el transporte electrónico en tilacoide aislado y la liberación de oxígeno en hoja intacta. Los resultados indican que el crecimiento se reduce en un 43 % en la salinidad más elevada, el calcio y el magnesio se pierden de todos los tejidos al aumentar el cloruro de sodio en el medio. De manera inversa el potasio aumenta en todos los tejidos. La concentración de clorofila aumenta con la salinidad, particularmente la clorofila a, aumentando de éste modo la relación clorofila a/b. La eficiencia fotoquímica de PSII y la liberación de energía por procesos fotoquímicos no se afectan. El acarreo electrónico *in vivo* e *in vitro* disminuye, así como la liberación de oxígeno en la hoja intacta. El pool de quinonas A y plastoquinona aumenta con el estrés. La salinidad induce un aumento de la liberación de energía por procesos no fotoquímicos. La tolerancia al estrés salino depende de una eficiente selectividad de la raíz entre el sodio y potasio, así como una distribución de los iones absorbidos en la raíz, tallo y hojas adultas, a fin mantener el crecimiento en las zonas meristemáticas. En conclusión, la regulación de la energía de excitación se da a través de una disminución de la absorbancia del cloroplasto, un incremento de la liberación de energía por calor o cambio de estado y/o transferencia a pigmentos no fluorescentes (spill over) y por un incremento de la poza de plastoquinona, todo con el fin de disminuir la presión de reducción en QA y el centro de reacción de PSII al encontrarse reducido el acarreo electrónico y la liberación de electrones en el complejo liberador de oxígeno por la salinidad.

INTRODUCCIÓN :

El crecimiento desmesurado de la población humana a nivel mundial demanda una mayor producción de alimentos. Se estima que la potencialidad de abrir nuevas áreas para el cultivo está llegando a su límite, la consecuencia de esto es que cada vez más se están haciendo uso de zonas edáficamente frágiles, como es el caso de bosques templados y lluviosos, los cuales en corto tiempo de uso intensivo pueden perder su rentabilidad. Una posible solución a este problema radica en la utilización de tierras que hasta la fecha no han sido cultivadas debido a las condiciones adversas que poseen.

Se ha estimado que de las 14,500 millones de hectáreas de tierra cultivable en el mundo, solo 1,400 (10% del total cultivable), están clasificadas como tierras con condiciones favorables para el cultivo (Christiansen y Lewis, 1987). El resto de ellas tienen una productividad limitada ya que presenta problemas de sequía o inundación, la capa arable es muy pequeña, presenta congelamiento permanente y/o falta o exceso de minerales.

Dentro de los suelos con exceso de minerales destacan los salinos, cuya principal característica es la presencia de altas concentraciones

de sales solubles, como el sulfato magnésico, sulfato sódico, cloruro sódico, carbonato sódico y cloruro magnésico (Long y Baker, 1986).

El problema de la salinidad existe en todo el mundo, incluyendo las regiones subhúmedas, pero es mucho más común en las zonas áridas y las semiáridas de la tierra. Se estima que de los 14,500 millones de kilómetros cuadrados de tierra cultivada en el mundo, dos millones presentan problemas de salinidad y de éstos entre 30 y el 50% son tierras de riego. Esto hace de la salinidad el mayor problema a nivel mundial para la producción de alimentos (Epstein et al, 1980 ; Yeo y Flowers, 1989).

Refiriéndose específicamente a la República Mexicana, ésta posee una extensión territorial de 200 millones de hectáreas, de las cuales 30 millones (15%) están dedicadas al cultivo. Se ha calculado que alrededor del 10%, (3 millones de hectáreas) de esta área cultivada presenta problemas de salinidad (Cortes, 1985), la mayoría localizadas en las zonas secas del norte del país (Cajuste, 1987).

La salinización de un suelo se puede originar por procesos naturales, como es el caso de las zonas costeras, las cuales anualmente son inundadas por agua salada del mar. Los suelos conocidos como halomórficos, se desarrollan por las altas

evapotranspiraciones, lo que provoca lixiviación de las sales hacia las capas superiores del suelo. Sin embargo, la salinización también se produce por la actividad del hombre. La mayoría se originan por la irrigación con aguas con altos contenidos de estos minerales o por el uso de suelos con poca drenación, lo que provoca que las sales, al evaporarse el agua, se acumulen progresivamente en la capa superior del suelo arable (Long y Baker, 1986).

Se han propuesto las siguientes alternativas para el uso de los suelos con problemas de salinidad :

1. Cambio del medio ambiente : Esto significa eliminar las sales en el suelo por métodos químicos o por manejo. Lo primero solo aminora el efecto causado por la sal, sin embargo no la elimina, además de que el insumo de estos métodos es muy elevado, haciendo la cosecha incosteable. El segundo implica métodos de manejo diversos como son : germinación controlada en surco, transplante en etapa menos sensible. Algunas plantas crecen bien en suelos moderadamente salinos, como es el caso de la remolacha, sin embargo son incapaces de germinar en ellos, caso contrario es el del frijol y el maíz (Pasternak, *et al*, 1979).

2. Incremento de la resistencia de los cultivos : Se realiza a través de cruza naturales entre especies tolerantes y sensibles del mismo género, o por cruza controladas entre especies de géneros diferentes o con ayuda de la ingeniería molecular, todo esto dirigido a extender la tolerancia de las plantas de interés económico más allá de lo natural.
3. Cambios de cultivo : Esto implica cultivar especies con mayor tolerancia o introducir otras nuevas en aquellas zonas con problemas (Yeo y Flowers, 1989).

Sin importar que camino se tome en el uso de estas alternativas, se requiere del conocimiento sobre los efectos fisiológicos y bioquímicos de la salinidad en las plantas, así como los mecanismos que permiten la tolerancia de las mismas al estrés por sal.

I. Efectos Fisiológicos:

Pasternak, en 1987, resume el efecto fisiológico de la salinidad en las plantas en tres vías:

A. Estrés hídrico.

El primer problema con que se encuentra una planta al crecer en un medio salino es la deshidratación, producto del bajo potencial hídrico del suelo por la concentración de sales que rodean la zona

radical (Long y Baker, 1986). El efecto nocivo en el crecimiento de la planta como resultado de la disminución de la turgencia celular está dado sobre los procesos de división celular y apertura estomática (Pasternak, op. cit.). La división celular está directamente relacionada con la elongación de la célula, la cual es a su vez producida por la turgencia celular. La falta de división celular tiene como resultado una disminución del área foliar y por lo tanto una menor área fotosintéticamente activa, originando una disminución en la talla de la planta. La apertura del poro estomático depende de la turgencia de las dos células guarda que rodean el poro. Una disminución en la turgencia tiene como resultado el cierre del poro, lo que produce una disminución del intercambio de CO_2 , teniendo como producto una reducción del crecimiento de la planta (Pasternak, op. cit.).

B. Desbalance Nutricional : Toxicidad iónica y desbalance iónico.

La toxicidad iónica esta dada por la acumulación excesiva de los iones en los tejidos. El cloro y el sodio son elementos esenciales en la planta, pero en la mayoría de los casos su concentración en el tejido no excede de $500 \mu\text{M}$. Se ha reportado que la acumulación excesiva de sodio y cloro en la célula, tiene efecto sobre la estabilidad de las membranas, afectando su permeabilidad y transporte (Long y Baker,

1986). Heal y Mengel, en 1981, reportan cambios en la composición lipídica de cloroplastos aislados de plantas sometidas a estrés salino. De igual manera, se ha reportado que la actividad de muchas enzimas se ve afectada por las altas concentraciones de sodio y cloro (Greenway y Munns, 1980).

El desbalance iónico en plantas bajo estrés salino se produce por un lado, cuando las altas concentraciones de las sales en el suelo influyen en la toma de otros elementos nutricionales necesarios para la planta y por otro lado, por el efecto que tienen las altas concentraciones de sales en la región apoplástica y/o citoplasmática, las cuales pueden provocar la pérdida de iones de la pared, de la membrana o del espacio citoplasmático y estructuras ahí contenidas.

C. Desbalance energético.

El crecimiento y el balance energético general de la planta puede ser afectado por un número de factores los cuales no están relacionados con la toxicidad iónica :

1. El ajuste osmótico con solutos orgánicos (alcoholes, aminoácidos y algunos azúcares), compite con los procesos de crecimiento al desviar los recursos para la síntesis de estos solutos. Esto último es un factor importante en aquellas plantas que compartamelizan el

exceso de iones en la vacuola y se ajustan osmóticamente con el medio externo a través de la síntesis de osmolitos orgánicos compatibles con la actividad celular citoplasmática.

2. La disminución del potencial hídrico celular, en respuesta a la salinización del suelo produce un cierre de los estomas regulado por la disminución de la turgencia celular y el disparo en la producción de ácido abscísico, hormona vegetal que induce el cierre estomático. Este cierre del poro estomático tiene como resultado una disminución en la tasa de fijación de CO_2 , lo que produce una reducción en el crecimiento de la planta. La reducción en la fijación de CO_2 incrementa los niveles de fotorespiración. La Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa (RuBisCO), al ser incapaz de fijar bióxido de carbono fija una molécula de oxígeno, generándose una molécula de glicerato 3-fosfato (de tres carbonos) y una de fosfoglicolato (de dos carbonos), entrando esta última al ciclo del glioxilato, donde se pierde una molécula de CO_2 y hay un gasto mayor de energía para regenerar la molécula de RuBisCO. Aun cuando la planta no tiene una ganancia positiva en incremento de peso seco cuando realiza fotorespiración, tampoco se detiene el proceso fotosintético por ausencia del aceptor final de los

electrones provenientes de la fase luminosa, el CO_2 (Krause y Weis, 1985).

3. Los procesos celulares que se ven incrementados por el estrés salino, como el caso del transporte activo de iones a nivel de la raíz, la membrana plasmática y vacuola, el mantenimiento de gradientes iónicos a nivel del plasmalema y tonoplasto, compiten por el abastecimiento de energía (ATP) con los procesos celulares involucrados en el crecimiento celular (Yeo, 1993).

II. Mecanismos de Tolerancia.

La tolerancia a las sales varía ampliamente en los vegetales. Existen plantas que pueden completar su ciclo de vida en sustratos altamente salinos (500 mM), mientras que otras sólo pueden desarrollarse de manera normal a concentraciones menores a 50 mM (Banul y Primo-Millo, 1992).

Aún cuando existen categorías intermedias, las plantas pueden clasificarse de manera general como "halófitas" y "glicófitas", para indicar su tolerancia o sensibilidad a la salinidad.

Los mecanismos de tolerancia a la salinidad se pueden agrupar en dos grandes estrategias :

1. Plantas que pueden seleccionar el tipo y cantidad de iones que incorporan.
2. Plantas que incorporan los iones sin una selectividad específica, pero que son capaces de compartimentar en vacuola aquellos que son tóxicos para el metabolismo celular.

En ambos casos, el potencial osmótico del citoplasma contra el del exterior, es equilibrado a través de la síntesis de compuestos orgánicos, los cuales en altas concentraciones no afectan el metabolismo celular. Ejemplo de estos son: betaína, prolina, glicinbetaína, algunos azúcares y proteínas, como la osmotina (Grieve y Mass, 1984 ; Hurkman y Tanaka, 1987).

Por otro lado, además de los mecanismos de tolerancia a la toxicidad iónica, Pasternak (1987) menciona que las plantas presentan estrategias para evitar la deshidratación de los tejidos como consecuencia del estrés salino.

III. Productividad en relación a la Salinidad :

Es comúnmente aceptado que altas concentraciones de sal causan una reducción en el crecimiento de la mayoría de los vegetales (Greeneway y Munns, 1980). Esto sucede en algunas plantas a

concentraciones por debajo de los 50 mM de NaCl (Banul y Primo-Millo, 1992). La mayoría de los estudios han demostrado que la salinidad inhibe el crecimiento afectando la expansión foliar y la tasa de asimilación neta por unidad de área (Longstreth y Nobel 1979 ; Long y Baker, 1986). La reducción del área foliar se origina por la reducción en la expansión celular, lo que da como resultado la disminución de la división celular.

La disminución de la tasa de asimilación neta se correlaciona positivamente con la reducción del área foliar fotosintéticamente activa, sin embargo, también se relaciona con la disminución de la fijación de CO₂ y al actividad fotorespiratoria (Long y Baker, 1986).

A. Reducción en la Fotosíntesis.

A nivel de toda la planta, la reducción del área foliar y los cambios en la estructura de la planta pueden disminuir la fotosíntesis, debido a la reducción de la intercepción de la energía luminica. Sin embargo, a nivel de la hoja individual, otros factores pueden modificar la intercepción de la luz, tales como la reflectividad de la hoja, por acumulación de ceras, la concentración de pigmentos por unidad de área y el estado fisiológico de la hoja y de las células (Long y Baker, 1986).

La productividad de un cultivo, está determinada, por un lado, por la eficiencia con la que se captura la energía electromagnética del sol y se traduce en energía química en forma de NADPH y ATP. Por otro lado, está determinada por la eficiencia con la que esta energía química en forma de NADPH+ H⁺ y ATP es utilizada para la fijación de bióxido de carbono y su posterior acumulación en forma de biomasa. Como se ha mencionado brevemente, las plantas sometidas a estrés salino disminuyen su capacidad fotosintética por la disminución del área foliar, sin embargo, de manera general la asimilación de CO₂ también se afecta por la baja conductancia estomática, así como por la disminución en el transporte electrónico, la fijación de CO₂ y el uso de fotosintetatos. Bajo estas condiciones de inhibición del uso de los fotosintetatos y de la energía química almacenada, la correcta regulación de la energía de excitación es de vital importancia para la vida de la planta, ya que el exceso de excitación en los fotosistemas puede ser potencialmente dañino a todo el sistema transductor de energía fotosintética. Un exceso de energía puede producir una desactivación total o parcial de los centros de reacción fotosintéticos y por ende una disminución de la capacidad transductora de energía lumínica en NADPH y ATP por parte del cloroplasto, disminuyendo a

su vez la fijación de CO_2 y por lo tanto la productividad de la planta (Baker y Ort, 1992).

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo es el evaluar el efecto del estrés con Cloruro de Sodio sobre el crecimiento, las relaciones iónicas y la fotosíntesis de *Triticum aestivum* L. cv. Pavón.

ANTECEDENTES:

I. Efectos de la Salinidad en la fotosíntesis.

A. Expansión foliar y estructura foliar:

El efecto del cloruro de sodio en la expansión foliar depende de la especie; sin embargo, se ha encontrado que concentraciones de 50 mM de NaCl reducen el área foliar en glicófitas (Long y Baker, 1986).

La inhibición de la expansión foliar, apuntan estos mismos autores, pudiera ser producto de dos procesos:

1. Reducción del número de células por inhibición de la división celular.
2. Reducción del alargamiento celular.

La razón de esta reducción, mencionan los autores, pudiera ser resultado de un efecto de la toxicidad iónica o por el estrés hídrico

impuesto en el suelo o celularmente por la acumulación en el apoplasto y/o en la pared celular.

La disminución del área fotosintéticamente activa, en plantas bajo condiciones de estrés salino, produce finalmente una disminución en el crecimiento de la planta y por ende una disminución en la producción, si hablamos de un cultivo agrícola. En trigo, se ha reportado que la salinidad produce una caída en la producción de grano total por espiga, así como en el peso del grano (Bechett y Van Standen, 1992; Botella, *et al*, 1993; Francois, *et al*, 1994).

Anderson, en 1988, apunta que las plantas pueden regular la cantidad de energía llegando a la hoja por mecanismos instantáneos o a través de procesos de tiempos largos. Estos últimos involucran procesos como la síntesis de complejos macromoleculares (acarreadores y transductores de energía fotosintética), síntesis de ceras en la epidermis de la hoja, aumento en el número de capas de células clorénquimatosas, etc. Por otro lado, otro mecanismo observado es el denominado "paraheliotropismo", que no es otra cosa que el evitar o provocar la exposición directa de la hoja a los rayos solares. Nadie ha discutido en un sentido adaptativo el hecho de la reducción del área foliar en las plantas sometidas a estrés salino, pero

una manera de reducir la pérdida de agua por transpiración y la cantidad de energía absorbida por la planta en unidad de área foliar, podría ser a través de la reducción del área foliar total. Se ha reportado que la salinidad, además de disminuir el área foliar, produce un incremento en el grosor del mesófilo, esto debido a un aumento en el número de capas de células, así como en el largo y diámetro de las mismas (Longstreth y Nobel, 1979). Estas modificaciones han sido vistas como un mecanismo adaptativo a la condición estresante, cuyo propósito de incrementar la eficiencia del uso del agua (Dowton, *et al.*, 1985).

B. Cambios estructurales : Pigmentos y Complejos Proteicos.

El estrés ambiental en la plantas puede provocar modificaciones en el desarrollo del aparato fotosintético, así como en su funcionamiento (Long y Baker, 1986). Los cambios estructurales reportados para las plantas bajo condiciones de salinidad, difieren dependiendo de su tolerancia a la misma y/o del tipo de sal estresante. En general, para la salinización con cloruro de sodio, el estrés provoca una reducción en la cantidad de clorofila por unidad de área foliar (Robison, *et al.*, 1983 ; Dowton, *et al.*, 1985 ; Seeman y Critchley, 1985). Esta reducción en la

cantidad de clorofila por unidad de área, podría relacionarse con la disminución de la tasa de asimilación de CO_2 , ya que, como apunta Baker (1991), la actividad fotoquímica depende de la habilidad de la hoja para capturar la energía lumínica y de la eficiencia por la cual la energía de excitación será utilizada para el trabajo fotoquímico; por consecuencia, cambios en el tamaño de los complejos antena, en la concentración de pigmentos y en la eficiencia cuántica tienen implicaciones directas sobre la tasa de asimilación de bióxido de carbono. Sin embargo, ésto también depende de la especie y su tolerancia al estrés salino. Seeman y Critchley, en 1985, encontraron que la salinización a 100 mM en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), provocaba una disminución drástica en la concentración de clorofila, al mismo tiempo que disminuía la asimilación de CO_2 . Un reporte posterior demostró que esta reducción era independiente del cierre estomático o del contenido de complejos fotosintéticos en la hoja, y más bien era producto de una disminución de la eficiencia de la Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (Rubisco). Ghenter y Melis (1984), estudiando el efecto de la salinidad sobre la fotosíntesis en espinaca, encontraron que la salinización con NaCl 100 mM durante cinco semanas disminuía la tasa de asimilación de CO_2 , pero no causaba

ningún cambio en el contenido de clorofilas, en la cantidad de PSII y PSI o en los componentes de la cadena transportadora de electrones por unidad de área foliar. Por otro lado Ashor y Thalooh, en 1989, reportan que bajo estrés salino (6000 ppm de NaCl), la concentración de clorofila en las plantas de *Beta vulgaris* se reduce al igual que el área foliar. Estos mismos autores reportan que la actividad de Clorofilasa aumenta, aun cuando la estabilidad de los complejos proteína-clorofila aumenta significativamente. Ashor y Thalooh (op. cit.), concluyen que esta estabilidad de los complejos podría ser importante en la actividad del aparato fotosintético bajo condiciones de estrés salino. Narendra, *et al.*, en 1989, reportan que células fotoautotróficas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), adaptadas a 425 mM de NaCl, muestran comparativamente con las controles, un incremento en los niveles de los polipéptidos D1, D2, 43Kd, 51Kd y 17Kd del fotosistema II, no encontrando cambios en los polipéptidos de PSI, ATPasa (CF-1) y plastocianina (PC). Mechthild y Santarius, en 1978, encontraron una disminución en la cantidad de galactolípidos de la membrana del cloroplasto, producto de la salinización a 400 mM en cebada (*Hordeum vulgare*). Por lo anterior, podemos pensar que la membrana fotosintética sometida a estrés salino sufre cambios

estructurales posiblemente como resultado del mismo estrés o como parte de un proceso de adaptación a la condición estresante llevando, en cualquiera de los casos a un incremento en la eficiencia del uso de la energía de excitación. Anderson, en 1986, apunta que las plantas se adaptan a su particular medio ambiente lumínico (cantidad, calidad y duración) a través de modificaciones de las membranas tilacoidales en forma coordinada e integrada, de tal manera que se haga el mejor uso del flujo energético disponible. Modulaciones en las proporciones relativas de los complejos antenas, en centros de reacción PSI/PSII, en los acarreadores electrónicos y en la ATPasa, tienen como resultado una influencia en la función y en la estructura de los tilacoides. Este razonamiento ha sido ampliamente investigado y se ha comprobado que las plantas se adaptan a la condición ambiental imperante modificando la estequiometría de los componentes estructurales de la membrana fotosintética, de modo que se utiliza la energía lumínica de la manera más eficientemente posible (Chow, *et al.*, 1990; Mckiernan y Baker, 1991).

Para el caso de estrés por salinidad, solo hay un reporte donde se relacionan los cambios en la cantidad de clorofila, en la relación entre la clorofila *a/b* y el grado de apilamiento de los tilacoides de lechuga

(*Láctica sativa*), con los mecanismos de control de la energía de excitación fotosintética (Carter y Cheesman, 1993). Estos autores, apuntan que dichos cambios no son producto de un daño provocado por el estrés salino, ya que son reversibles; sino, más bien, estas diferencias se dan como resultado de un mecanismo adaptativo de ajuste fotosintético.

En trigo, los efectos de la salinidad sobre la estructura del aparato fotosintético, varían de acuerdo a la tolerancia presentada por el cultivar utilizado, así como a la manera en que se aplica la salinización (KrishnaRaj, *et al*, 1992).

C. Conductancia estomática y la fijación de bióxido de carbono.

A intensidades saturantes de luz, la fotosíntesis está limitada por la velocidad de difusión del bióxido de carbono al interior de la hoja, lo que a su vez está controlado por la resistencia estomática y la resistencia del mesófilo (Longstreth y Nobel, 1979). La limitación en la fotosíntesis por el estrés salino puede ser atribuida a dos causas: (1) Limitación debida a la reducción de la conductancia estomática, y (2) Reducción en la velocidad de los procesos bioquímicos (Plaut, *et al.*, 1990; Seeman y Critchley, 1985). Plaut, *et al.*, 1990, trabajando con

una variedad de frijol (*Vigna unguiculata* L.), encontraron que a bajas concentraciones de NaCl, la asimilación de CO₂ estaba controlada básicamente por la reducción de la conductancia estomática. Sin embargo, Seeman y Cristchely, en 1985, y Seeman y Sharkey, en 1986, demostraron que en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) salinizado a 100 mM de NaCl, la conductancia estomática se reducía en 70%, comparado con el control, pero cuando se incrementaba de manera artificial los valores de bióxido de carbono interno (C_i), la asimilación de CO₂ no se restituía, por lo cual concluyen que la disminución de la tasa de asimilación de CO₂ (A), es independiente del cierre estomático y se debe más bien a una disminución en la actividad de la RuBPCase. Plaut, *et al.*, en 1990, encontraron que la disminución de (A), estaba relacionada linealmente con la acumulación de sodio en la hoja; Seemann y Critchley (1985), encontraron que la disminución de (A) en frijol común, se relaciona con la acumulación de cloro en el citoplasma, vacuola y cloroplasto.

En trigo, la reducción en la tasa de asimilación de CO₂ (A), depende de la sensibilidad del cultivar. Jensen, en 1975 (citado por Long y Baker, 1986), reportó una disminución del 21% en (A), bajo condiciones de luminosidad saturante (600 μmol/m². seg), cuando el

cultivar "Diamante" era crecido a 210 mM de NaCl y solo una reducción de 2% en (A) cuando era crecido a 105 mM. Kingsbury, *et al.*, en 1984, encontraron que el cultivar tolerante PI 78704 disminuía la tasa de asimilación de CO₂ en un 51% cuando era crecido en agua de mar al 40% (200 mM de NaCl, aproximadamente), a diferencia del cultivar sensible PI 94353, el cual a la misma concentración disminuía en un 69%. Kingsbury y Epstein, en 1986, en un estudio posterior con estas misma variedades, demostraron que el efecto de la salinización se relacionaba con el ion sodio y no con el cloro.

D. Transporte electrónico:

La acumulación de iones sodio y cloro en el cloroplasto de plantas glicófitas y halófitas, afecta primordialmente el transporte de electrónico desacoplado entre PSII y PSI (Wignarajah y Baker, 1981). Esta disminución en el transporte, reportan los autores, no se debe a una disminución en la eficiencia de los complejos antena, ni a la transferencia de energía al centro de reacción. Por otro lado, Saradhi y Mohanty, en 1992, trabajando con tilacoides aislados de plantas salinizadas a 200 mM de NaCl de *Brassica juncea*, encontraron una estimulación del transporte electrónico desacoplado desde el agua

hasta varios aceptores de electrones después de PSII (Dicloroindofenol (DCPIP), ferricianuro, fenildiamina, diclorobenzoquino); además de que se generaba un flujo de protones mayor en las salinizadas, pero con una menor permeabilidad de la membrana a los protones, comparada con la de los controles.

En cuanto al transporte acoplado desde PSII hasta PSI no se ha encontrado ningún efecto por la salinización (Long y Baker, 1986). Baker y Dominy, en 1984, reportan que la salinización hasta 100 mM de NaCl en espinaca, no afecta el transporte electrónico *in vivo* de PSII a PSI (autores citados por Long y Baker, 1986).

En el caso de salinizaciones *in vitro*, se ha reportado que la salinización de plantas halófitas como la *Avicenia marina*, con 250 mM de NaCl, estimula el transporte de electrones en tilacoides a nivel del PSII (Critchley *et al.*, 1982). González, *et al.*, en 1993, reportan un patrón similar en tilacoides de *Avicenia germinans* salinizados *in vitro*, encontrando estimulación para el transporte desde el agua (PSII) hasta el Metil viologeno (PSI); sin embargo no encontraron inhibición del transporte desde DCMU-Ascorbico-DCPIP hasta metil Viologeno (PSI), cuando se salinizaba *in vitro* hasta 1M con NaCl. Existen, por otro lado, resultados contrarios a los antes citados, Satoh *et al.*, en

1983, reportan que salinizaciones altas, 169‰ de NaCl, en el alga marina *Porphyra perforata*, produce una disminución de la cantidad de energía llegando a los centros de reacción, posiblemente por un efecto sobre los complejos antena, además de afectar el transporte electrónico a nivel del sitio oxidante de PSII (en el lado del complejo liberador de oxígeno) y en el lado reductor de PSII (a nivel de Qa).

Como se puede observar, los reportes son contradictorios y se ven influenciados según el tipo de organismo usado y la metodología utilizada para la medición. Sin embargo, existe un consenso en cuanto a los efectos en el fotosistema II (Long y Baker, 1986). La salinización afecta tanto el lado oxidante de PSII, posiblemente a nivel de complejo liberador de oxígeno, y a nivel del lado reductor de PSII, entre los sitios en donde aceptan electrones el DAD (fenilamida) y el DCPIP. Este efecto es ion específico; es decir, no es reproducible utilizando un estrés osmótico (Long y Baker, 1986).

E. Fijación de CO₂ : Actividad enzimática y regeneración de precursores .

Como se ha mencionado, la salinidad inhibe la expansión foliar, lo que se refleja en una disminución del área foliar. Al reducirse el área

disponible para la intercepción de la luz, la productividad disminuye tanto en las plantas individuales, como en cultivos. Los parámetros de crecimiento afectados dependen de la planta y su tolerancia. Por un lado se afecta la tasa de incremento de área foliar (LAR) y en otros caso se afecta la velocidad de asimilación neta (NAR). Se podría pensar que si disminuye la asimilación neta (NAR), entonces disminuiría la tasa de incremento foliar (LAR). Sin embargo, para girasol sometido a estrés salino moderado, el área foliar disminuye, pero por otro lado, los niveles de almacenamiento de productos asimilados se incrementan, lo que sugiere que el efecto de la salinidad está dado en la utilización de los fotosintetatos, más que en la fotosíntesis misma (Rawson y Munns, 1984, citados por Long y Baker, 1986). En arroz, cuando se analiza la tasa de crecimiento relativo (RGR), el cual es la función del producto de $(LAR) \times (NAR)$, se encuentra que a concentraciones bajas de NaCl (50 mM), LAR, es el primordial causante de la disminución de RGR, pero cuando la salinidad es aumentada a 80 mM, entonces NAR es el principal factor de disminución de la tasa de crecimiento relativo (RGR). El mismo patrón se reporta para plantas halófitas como *Aster tripolium*, *Atriplex californica* y *Ambronia maritima* (Long y Baker, 1986).

En estudios hechos en frijol común (*Phaseolus vulgaris*), Seeman y Critchley, en 1985, encontraron que la salinización afectaba la actividad de RuBPCase, disminuyendo hasta en un 40% la actividad *in vivo*, además de afectar el rendimiento cuántico para la fijación de CO₂, saturándose las plantas salinizadas a intensidades lumínicas más bajas que las plantas control. Por otro lado, no encontraron cambios en el contenido de nitrógeno total, ni tampoco en la cantidad de RuBPCase por unidad de área foliar. Sin embargo, en un estudio posterior, Seeman y Sharkey (1986), reportan que parte de esta reducción y saturación está dada por una deficiencia en la regeneración del sustrato inicial de la carboxilación, la ribulosa 1,5 bifosfato.

F. Niveles ionicos intracloroplásticos.

Estudios *in vitro* han demostrado que la actividad de las enzimas citoplasmáticas aisladas de plantas glicófitas como de halófitas es igualmente susceptible al estrés salino, lo que indica que en aquellas plantas que presentan tolerancia a la salinidad, sean halófitas o glicófitas. Por otro lado, el metabolismo celular no se ve severamente afectado por razones de que existen moléculas constitutivas o sintetizadas *de novo*, las cuales "protegen" la maquinaria enzimática

o bien los iones se acumulan en la vacuola u otro organelo. Se ha observado que entre estos organelos, el cloroplasto juega también un papel importante en la compartimentación de iones, tanto en plantas halófitas como en glicófitas tolerantes a la salinidad (Wignarahah y Baker, 1981). Robison, *et al.*, en 1983, encontraron que la salinización hasta 200 mM de NaCl, provocaba cambios en los niveles iónicos internos de cloroplastos aislados de espinaca. El potasio disminuía de 210 mM a 121 mM, el sodio aumentaba de 96 mM a 165 mM, el cloro de 100 mM a 117 mM y el fosfato inorgánico (Pi) de 24.2 mM a 11.9 mM. Seeman y Critchley, en 1985, encontraron que en frijol común salinizado hasta 150 mM las relaciones iónicas intracloroplásticas solo se modifican significativamente para el cloro, el cual aumenta hasta 5 veces el valor encontrado para el control.

En trigo, aun cuando no se han hecho estudios sobre el contenido iónico intracloroplástico de plantas salinizadas, se ha encontrado que el catión que más se incrementa en las hojas es el sodio, sin embargo esto depende de la tolerancia del cultivar con que se trabaje (Schachtman y Munns, 1992).

Mill y Baker, en 1978 (autor citado por Wingnarajah y Baker, 1981), han demostrado que los cambios en las concentraciones de cationes

en el medio del tilacoide pueden inducir cambios en el potencial superficial y la diferencia de potencial a través de la membrana, lo cual pudiera provocar alteraciones en la microconformación de la membrana, afectando a su vez las actividades de la misma. Cambios en la concentración iónica intracloroplástica pueden también alterar la actividad de la membrana, afectando las interacciones entre los componentes protéicos y lipídicos del tilacoide. Se ha sugerido que los cationes específicamente incrementan las interacciones hidrofóbicas entre los componentes de la membrana al generar cambios en las interfases lipídicas-protéicas (Wignarajah y Baker, 1981).

II. Regulación de la absorción lumínica y la energía de excitación.

La eficiente regulación de la energía de excitación para la asimilación de bióxido de carbono fotosintético, puede ser un factor determinante en la producción de fotosintetatos de una planta (Baker, 1992; Baker y Ort, 1992). Bajo condiciones de estrés, como en el caso de la salinidad, donde la capacidad de asimilación de CO₂ se reduce significativamente, la energía lumínica capturada por las hojas pudiera ser potencialmente dañina al aparato fotosintético. Aun cuando existen

muchos estudios sobre los efectos de la salinidad sobre la fotosíntesis, poco se ha estudiado sobre los mecanismos que le permiten a la planta regular la energía de excitación bajo condiciones de estrés. Durante el estrés por sal, como ya se ha mencionado, la fijación de CO₂ disminuye por cierre estomático o por efectos del mismo estrés sobre la carboxilación del bióxido de carbono, por lo cual se esperaría que la velocidad de flujo electrónico se modificara o disminuyera debido a que existe una reducción en los requerimientos de energía metabólica o al menos una disminución en la velocidad de recambio de moléculas de alta energía como ATP y NADPH, las cuales son productos del acarreo electrónico dependiente de la liberación de oxígeno (Pammenter, *et al.*, 1993). Esta disminución podría estar dada por un control de la excitación a nivel de los fotosistemas más que por un efecto directo del estrés sobre los acarreadores electrónicos (Carter y Cheeseman, 1993; Pammenter *et al.*, 1993; Chow *et al.*, 1990; Johnson, 1993).

La importancia de la regulación de la energía de excitación, radica en el hecho de que la sobre excitación de los fotosistemas por alta luminosidad en condiciones de bajo requerimiento metabólico, provoca una sobreredución de los fotosistemas, lo cual si no es controlado,

induce una fotodestrucción de los mismos (Baker y Horton, 1987; Krause, 1988; Horton y Ruban, 1993). Aun cuando no se han realizado estudios sobre este aspecto, procesos de fotoinhibición pudieran sumarse a la reducción en el crecimiento bajo el estrés salino (Krause, 1991; Ogren y Rosenqvist, 1992).

La fotoinhibición es producida por la generación de radicales altamente reactivos a nivel de los centros de reacción (Asada y Takahashi, 1987). Se ha encontrado que el fotosistema II es mucho *más susceptible a esto fenómeno* (Krause, 1998; Horton y Ruban, 1992). La fotoinhibición en el fotosistema II provoca la destrucción de un proteína estructural de 43 kd en el centro de reacción, conocida como D1 o sitio de unión de Qb. La síntesis *de novo* de esta proteína restablece la actividad de los fotosistemas II (Virgin, *et al.*, 1992). Se desconoce cual es el mecanismo degradativo, pero se cree que están involucradas especies altamente reactivas como oxígenos en singlete y clorofilas en triplete. Por otro lado la sobreexcitación de la clorofila, eleva a un estado de excitación de triplete, lo cual permite que reaccione directamente con el oxígeno, oxidándola y degradándola, produciendo clorosis de la lámina foliar. (Sadmam, *et al.*, 1993). Este último hecho, la clorosis en hojas, se ha reportado en plantas bajo

estrés salino y ha sido atribuido por muchos autores a una deficiencia de magnesio o nitrógeno (Greenway y Munns, 1980); sin embargo no se han hecho estudios sobre la fotooxidación de la clorofila bajo condiciones de salinidad.

III. Mecanismos de regulación de la energía de excitación fotosintética.

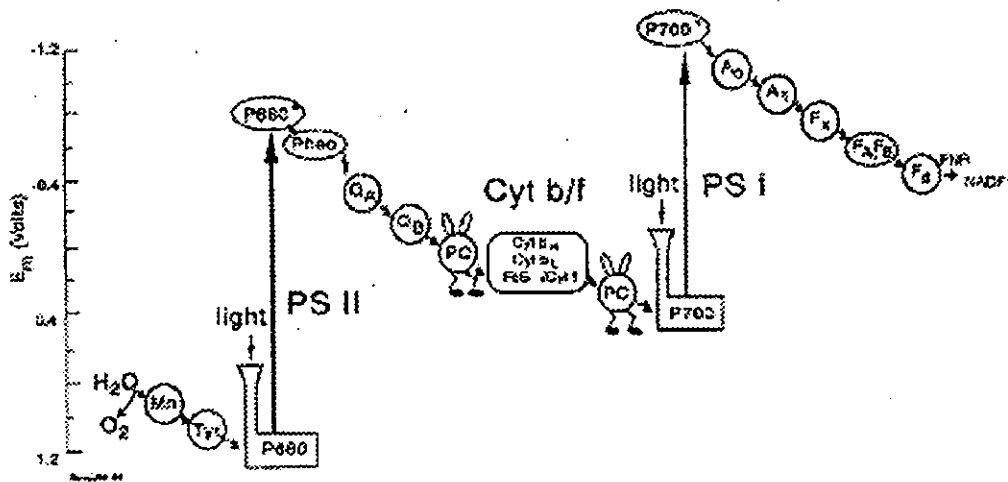


Figura 1
Esquema Z o reacción de Hill. Cadena transportadora de electrones fotosintética.

El desarrollo del esquema "Z" o la reacción de Hill (Figura 1), por Robin Hill y sus colaboradores, estableció que la excitación entre los fotosistemas debería estar balanceada de tal forma que se pudiera

obtener el máximo de rendimiento por cuanto absorbido. Por otro lado, dejo entrever que debería existir un mecanismo flexible que permitiera regular este balance de excitación (Horton y Ruban, 1992).

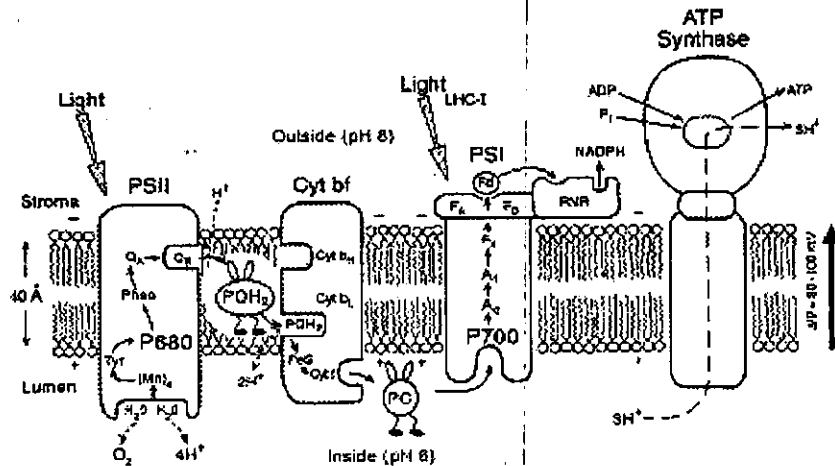


Figura 2
Cadena transportadora de electrones, membrana del tilacoide en el cloroplasto.
fotosistema II (P680), fotosistema I (P700)

Es ahora reconocido que las membranas tilacoidales no son estáticas en composición (Figura 2), ni en organización, sino más bien son altamente eficientes en la regulación del rendimiento cuántico para una situación dada (Melis, 1991; Anderson, 1986). Esta respuesta molecular de organización y eficiencia fotosintética, permite que los tilacoides lleven a cabo sus funciones de reducción del NADP $^+$ y síntesis de ATP, sintonizadas a la demanda metabólica imperante, sea

de luz, CO₂, temperatura, etc. (Anderson, 1986; Melis, 1991; Heber, *et al*, 1990).

Básicamente, cuando un impulso luminoso llega a los complejos antena, se canaliza la energía de excitación al núcleo del centro de reacción, donde se inicia la separación de cargas, excitándose los fotosistemas II y I e iniciándose el acarreo electrónico. La molécula de clorofila "a" del núcleo del centro de reacción absorbe un fotón de energía y es excitada a un nivel energético mayor. Los niveles de energía que el electrón puede alcanzar depende de la energía contenida en el fotón absorbido por la clorofila. La energía contenida en el electrón excitado puede ser canalizada para realizar trabajo; de no ser así, la molécula de clorofila regresa a su estado basal liberando la energía absorbida en forma de calor o luz. La luz emitida por los electrones descendiendo del estado de excitación de primer singlete se conoce como "*fluorescencia*"; éstos fotones son emitidos en una longitud de onda mayor a la de excitación (685 nm para la clorofila del centro de reacción del fotosistema II en cloroplastos intactos).

La energía canalizada para realizar trabajo es la función esencial del la fase luminosa de la fotosíntesis. La energía de excitación es convertida en energía química en la formación de ATP y NADPH. La

energía conservada en estas moléculas (ATP y NADPH), puede a su vez ser liberada en la fijación de CO₂, la fijación de oxígeno y la reducción de nitrógeno, azufre y dobles enlaces de fosfolípidos. De esta manera, parte de la energía de excitación que llegó a los fotosistemas puede ser canalizada al trabajo fotoquímico (qP) (Horton y Bowyer, 1990; Horton, *et al.*, 1992; Krause y Weis, 1991; Krall y Edwards, 1992; Heber y Walker, 1992).

A intensidades más altas, el requerimiento energético para la fijación de CO₂ y los demás trabajos fotoquímicos, no alcanzan a drenar toda la energía de excitación arribando a los fotosistemas y los complejos antena, por lo que se activan procesos de disipación o decaimiento de la energía de excitación que está de más y la cual es potencialmente dañina para los fotosistemas (Heber, *et al.*, 1990). éstos procesos de disipación son llamados No-fotoquímicos (qNP), por no estar conectados a la generación de ningún producto, sino más bien a la liberación de la energía de excitación por calor. De esta manera, la regulación lumínica en el aparato fotosintético está dada por disipación fotoquímica (qP) y no-fotoquímica (qNP); la primera domina a intensidades bajas y la segunda a intensidades altas de energía de excitación (Horton, *et al.*, 1990).

Los procesos relacionados con la disipación o decaimiento No-fotoquímico pueden ser razonados de la ecuación propuesta por Butler *et al.*, en 1977 (citado por Krause y Weis, 1991), donde el producto de la fluorescencia (F) esta dado por :

$$F = \frac{k_f}{(k_f + k_d + k_T + k_p)}$$

donde k_f , es la constante de la fluorescencia; k_d , es la disipación de energía por procesos térmicos; k_T , es la disipación de energía por transferencia a pigmentos no fluorescentes; k_p , es la disipación energética por trabajo fotoquímico (Horton y Boyer, 1990).

Los procesos de decaimiento térmico (k_d), estan relacionados con la energización del cloroplasto, producto del establecimiento de un gradiente protónico. Este proceso conocido como qE , es el que más contribuye con la disipación de energía de excitación en condiciones de alta luminosidad (Krause, 1988). Horton, *et al.*, en 1990, mencionan que la energización de la membrana del tilacoide vía un gradiente electroquímico establecido por el acarreo electrónico, pudiera ser la señal de control entre el acarreo electrónico y la fijación de CO_2 .

Recientemente se ha encontrado la relación entre la disipación de la energía de excitación y el gradiente protónico. Los carotenoides asociados al complejo antena de PSII, específicamente las *vioxalantinas* sufren una de-epoxidación para convertirse en *zeaxantinas*. Se ha comprobado que la zeaxantina en los complejos antena es capaz de aceptar la energía de excitación de la clorofila en singlete, disipándola en forma de calor. Cuando disminuye la presión de excitación sobre el fotosistema II la zeaxantina es nuevamente convertida en vioxalantina. Este ciclo conocido como de las *vioxalantinas* se ha encontrado en todas las plantas superiores y algas verdes y se reconoce participa con el gradiente protónico en la regulación de la energía de excitación en PSII (Demmig-Adams y Adams, 1996).

La disipación de energía por transferencia a pigmentos no fluorescentes (kT), se conoce como cambios de estado o qT. La cantidad de energía que qT puede disipar no es mucha si se compara con qE, sin embargo es un proceso muy importante en el balance de excitación entre los dos fotosistemas. El mecanismo molecular de qT es materia de investigación, pero se sabe que cuando el fotosistema II es sobre excitado a comparación del fotosistema I, el complejo

macromolecular de la antena periférica del fotosistema II puede ser liberada por un mecanismo de fosforilación. La fosforilación de este complejo, al parecer marca una igualdad de cargas, repeliéndose del centro de reacción y migrando hacia la zona no apilada del tilacoide. Se cree que este complejo se une al fotosistema I y libera su energía en éste, balanceando de esta manera la excitación entre ambos sistemas. No se tienen resultados convincentes de este último acontecimiento, sin embargo, se ha comprobado la liberación del complejo antena, lo cual de entrada disminuye la cantidad de energía llegando al fotosistema II (Baker, 1991). La emisión de fluorescencia (kf), es el proceso que menos contribuye con la disipación de energía de excitación, si acaso el 3%; sin embargo, ha sido de gran utilidad en el estudio de los mecanismos de regulación de la excitación, ya que bajo condiciones normales es constante y como se puede observar en la ecuación de Butler, *et al*, (1997), compite con los demás procesos fotoquímicos y no-fotoquímicos por la energía de excitación (Horton, Bowyer, 1990; Horton y Ruban, 1992; Krause y Weis, 1991; Baker, 1991). De esta manera, los cambios en la intensidad de la fluorescencia han sido usados, desde 1930, para reconocer la contribución de cada proceso de disipación, así como la relación de la

emisión de la fluorescencia con la eficiencia de absorción fotónica, el transporte electrónico, la liberación de oxígeno y la fijación de CO₂.

El estudio de la fluorescencia es un método no intrusivo de amplia aplicación en la medición de los procesos primarios de la fotosíntesis (Gorkow, 1986; Renger y Schreiber, 1986).

Básicamente, toda la fluorescencia emitida a temperatura ambiente se origina en el fotosistema II. La emisión está dada en una banda con un pico máximo de 685nm. Cuando una suspensión de cloroplastos o una hoja se preconditiona a la oscuridad, permitiendo que todo el complejo acarreador esté oxidado, al ser iluminado, la emisión de fluorescencia se incrementa hasta un primer estado conocido como Fo, o fluorescencia mínima, esta fluorescencia es emitida en la transferencia de energía del complejo antena al centro de reacción y se obtiene cuando aún no se lleva a cabo la separación de cargas y todos los primeros acarreadores están oxidados o abiertos. La fluorescencia se incrementa de Fo a Fm, el estado máximo de la fluorescencia, el cual se alcanza la excitación es saturante. Fm se alcanza cuando todo Qa y Qb están reducidos o cuando todos los centros de reacción están reducidos o cerrados. La fluorescencia variable (Fv), es la fluorescencia entre Fo y Fm ($Fv = Fm - Fo$). El valor

de F_v/F_m , se ha encontrado ser extraordinariamente constante en plantas provenientes de ecosistemas muy contrastantes, $F_v/F_m = 0.833 \pm 0.001$. Este valor es indicativo de la eficiencia fotoquímica del fotosistema II o la probabilidad de absorción fotónica del fotosistema II, cuando todos los centros de reacción se encuentran cerrados. Se ha encontrado una relación lineal entre F_v/F_m y el rendimiento cuántico para fijación de CO_2 y la liberación de oxígeno dependiente de la fijación de CO_2 bajo condiciones de ausencia de fotorespiración. La eficiencia fotoquímica del fotosistema II, se ha visto que se reduce por el aumento de los procesos de disipación no-fotoquímica (q_{NP}) y por procesos de fotoinhibición en condiciones de estrés por altas y bajas temperaturas (Krause y Weis , 1991; Horton y Bowyer, 1990; Baker y Horton, 1987). Según el modelo de Genty, *et al.*, (1989), el valor de la disipación fotoquímica (q_P) multiplicado por F_v/F_m , da como resultado la eficiencia del transporte electrónico no-cíclico (Φ_{II}), medido bajo condiciones de ausencia de fotorespiración. Este parámetro es de gran utilidad, pues se ha observado guarda una relación lineal con la tasa de asimilación de CO_2 (Genty, *et al.*, 1989; Baker, 1992).

La emisión de fluorescencia *in vivo* o *in vitro* se ha usado como un parámetro de detección inmediata del estado fisiológico del aparato

fotosintético y ha sido una herramienta de mucho valor para detectar los cambios producidos por estrés abiótico (Renger, y Shreiber, 1986). Para el caso del estrés producido por salinidad, los parámetros de la fluorescencia, sobre todo, los de la cinética de Kautsky, han sido utilizados como una prueba para seleccionar cultivares con tolerancia a la salinidad (Belkhodja *et al*, 1994; KrishnaRaj, *et al*, 1992; Smillie y Nott, 1982).

IV. Tolerancia a la salinidad en la tribu Triticeae.

Según Jeschke (1984), la tolerancia a la salinidad, es la habilidad de una planta para crecer y cumplir su ciclo de vida en sustratos que contienen altas concentraciones de sales, particularmente NaCl.

Las investigaciones en la tribu Triticeae han descubierto una alta tolerancia a la salinidad, siendo estas plantas, junto con la cebada y el algodón, de las glicófitas que más toleran la salinidad (Yeo y Flower, 1989). Las especies de trigos modernos hexaploides, presentan elevada tolerancia a la salinidad, pudiendo completar todo su ciclo de vida hasta en 250 mM de NaCl (Kingsbury, *et al.*, 1984). Los trigos modernos utilizados para harina de pan, son hexaploides (*Triticum aestivum* L.); esto es, son alopoliploides, conteniendo 3 genómas

designados como : A, B y D. El genóma D, se cree se originó de su ancestro *Aegilops squarrosa*. La importancia de este genóma, cuando se compara con las especies amfiploides AABB, AA y SS, es que se ha confirmado confiere una característica de tolerancia a la salinidad por selectividad iónica, esto es, las especies con el genóma DD tienen la capacidad de controlar la proporción de sodio y potasio que entra en la planta, manteniendo la relación Na/K menor a 1 (Gorham, *et al.*, 1987). Otra característica importante que se han observado en las especies que contienen este genóma, es la capacidad de mantener niveles bajos de sodio y cloro en las partes jóvenes de la planta, así como del tejido meristemático (Yeo y Flowers, 1989; Gorham, 1994). Por otro lado, se ha visto que este genóma, confiere características de mayor productividad cuando se compara con las especies amfiploides que no lo poseen.

La tolerancia a la salinidad para los trigos modernos depende en gran parte del estado fenológico en el que se aplica el estrés salino. Botella, *et al.*, en 1993, reportan que los trigos son muy tolerantes a la salinidad durante las etapas de germinación y de llenado de la espiga, y por otro lado muy sensibles durante la etapa vegetativa y al inicio del desarrollo de la espiga. En la mayoría de los trabajos, la salinización

se aplica a las plantulas con ciertos días de emergencia y pocos son los estudios reportados aplicando del estrés desde la germinación.

Por lo anterior, el presente trabajo tuvo por objetivo:

1. Describir los efectos de la salinidad sobre el crecimiento de *Triticum aestivum* cv. Pavón.
2. Estudiar la distribución catiónica (Na^+ , K^+ , Mg^{++} y Ca^{++}) en *Triticum aestivum* cv. Pavón bajo condiciones de estrés salino.
3. Caracterizar los mecanismos de regulación de la energía fotosintética en *Triticum aestivum* cv. Pavón bajo condiciones de estrés salino.

METODOLOGÍA :

I. Material Vegetal

Se utilizó un cultivar de trigo hexaploide *Triticum aestivum* L. cv. Pavón, el cual es un trigo enano de invierno liberado en 1976, por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y el Trigo (C.I.M.M.y T.) el cual está recomendado por el Programa Nacional de Semilla (PRONASE) para la región de la mesa central de nuestro país.

II. Condiciones de Crecimiento

Las plantas se obtuvieron desde semilla según las siguientes condiciones :

A. Crecimiento

Las plantas fueron salinizadas desde semilla, en contenedores de plástico de 6 litros de capacidad, 20 plantas por contenedor: "cultivo de baja densidad", o 50 plantas por contenedor "cultivo de alta densidad". Se utilizó como sustrato agrolita. El sustrato fue inicialmente saturado con solución nutritiva Hoagland (González y Peñalosa, 1981) e inmediatamente se obtuvo el peso de cada contenedor, esto con la finalidad de recuperar el peso cada segundo día con agua destilada.

Las plantas se cultivaron en un invernadero externo bajo condiciones naturales de fotoperíodo, temperatura y humedad relativa. La temperatura fluctuó entre los 8 a 35°C, la humedad relativa entre 20 y 80 % y la densidad de flujo fotónico (DDF) máxima fue de 1600 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{seg}$ (400-700 nm).

B. Tratamientos

Los tratamientos de salinidad fueron: 0 mM (control), 75 mM y 150 mM de cloruro de Sodio; éstos iniciaron desde la germinación adicionando el NaCl a la solución nutritiva Hoagland (Beckett y Van Staden, 1992).

III. Tamaño de la muestra y diseño experimental

Las mediciones se realizaron entre los 21 y 28 días después de la siembra, momento en el cual la planta se encontraba fenológicamente en la mitad de su etapa vegetativa, con cinco hojas emergidas para todos los tratamientos. Para las mediciones *in vivo*, se utilizaron la segunda y tercera hoja de cada plántula, esto debido a que se presentan diferencias en cuanto al contenido de sodio, magnesio, calcio y potasio, según el grado de salinización y la edad de

la hoja. Para el caso del aislamiento de tilacoides y los ensayos *in vitro* se utilizó el tejido foliar de toda la planta.

El experimento consistió en un diseño en bloques de donde se hicieron de 3 a 15 repeticiones por bloque. Cada experimento se repitió un mínimo de dos veces. Los datos fueron analizados utilizando un programa computacional de análisis de varianza.

IV. Análisis del Crecimiento

A. Germinación

El efecto del NaCl sobre la germinación se cuantificó según el siguiente método:

1. Lotes de 20 semillas ($n=5$) se dispusieron sobre una capa de gasa en cajas petri negras y se incubaron en una cámara húmeda oscura a 30°C.
2. A cada caja se le agregó 8 ml de una solución salina de acuerdo a los siguientes tratamientos : 50, 100, 150, 200 y 250 mM de NaCl. Al lote control se le adicionaron 8 ml de agua destilada. Las soluciones fueron cambiadas cada segundo día y la germinación se registró a las 144 horas, considerando como

germinación cuando se observaba claramente la radícula y el hipocotilo.

B. Análisis del desarrollo:

1. Crecimiento: Los muestreos se realizaron en plantas de 28 días (n=10), a las cuales se les midió su longitud de vástago y raíz, así como su peso en fresco. Cada planta por separado fue secada en una estufa a 70°C durante 72 hrs. para después registrarse su peso seco.
2. Área foliar: El registro del área foliar por planta se llevó a cabo utilizando material de 28 días de crecimiento (n=5). Solo se consideró el área foliar de las hojas completamente abiertas y no senescentes, siendo para todos los tratamientos las hojas 2,3,4 de cada planta. El área foliar se cuantificó utilizando un método gravimétrico.

C. Análisis iónico

La cuantificación de los iones se realizó en raíz y vástago, considerando este último como las hojas 1,2,3 y 4 de cada planta. La cuantificación se hizo a los 28 días de crecimiento, para lo cual se muestrearon 15 plantas de 3 unidades experimentales y se depositaron por separado la raíz, tallo y el vástago (hojas 1,2,3 y 4) en

sobres de papel, para después secarse en la estufa a 70°C por 72 hrs. Las muestras secas se pulverizaron y de cada una se tomó 30 mg, a las cuales se les agregó 4 ml de ácido nítrico concentrado y se permitió su digestión durante 72 hrs., acelerando la digestión con calor. Las muestras digeridas se aforaron a 100 ml con agua bidestilada y se les midió la concentración de calcio y magnesio por Absorción atómica (Pye-Unicam). Los iones potasio y sodio se cuantificaron por Flamometría (Corning), utilizando una curva patrón de cada ion para realizar los cálculos (Velasco, 1994).

V. Análisis de la Fluorescencia in vivo

A. Eficiencia Fotoquímica de PSII (Fv/Fm)

1. Eficiencia fotoquímica para PSII: La eficiencia de absorción fotónica de PSII, cuando los centros de reacción esta abiertos, fue medida usando un fluorómetro portátil (MF5M Hansatech). Las plantas de 28 días fueron transportadas al laboratorio a las 9:00 hrs y aclimatadas 2 hrs a una DFF de 3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{seg}$. y a una temperatura de 28°C. Transcurrido el tiempo de preacondicionamiento, se cortó la segunda hoja de la planta (n=4) y se incubó a la oscuridad durante 15 minutos a 25°C, en una atmósfera normal de CO₂ (330ppm aproximadamente).

La inducción de la fluorescencia se llevó a cabo utilizando una luz modulada amarilla (850 Hz) de baja intensidad ($3 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{seg}$), con la cual se obtuvo el valor de fluorescencia mínima (F_o) después de un minuto de estabilización de la señal. El valor de fluorescencia máxima se registró sobreponiendo un pulso de 0.8 segundos de luz blanca saturante ($8000 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{seg}$) emitida por una fuente de iluminación alterna (PLS1-Hansatech). El protocolo de inducción esta resumido en la figura 3 (Krause y Somersalo, 1989; Van Kooten y Sneal, 1990). La eficiencia fotoquímica se obtuvo directamente de estos valores según la siguiente formula :

$$\text{EFICIENCIA FOTOQUÍMICA DE PSII} = \frac{(F_o - F_m)}{F_m}$$

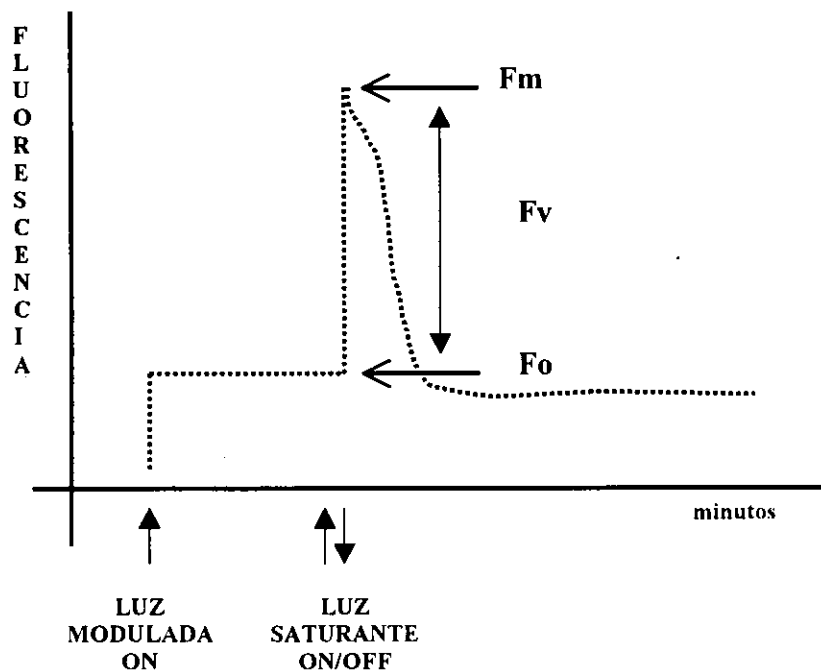


Figura 3

Protocolo de inducción de la fluorescencia para la obtención de los valores de F_o , F_m y F_v .

B. Tamaño relativo de Qa y PQ

El tamaño relativo de la poza de Quinonas "a" y la poza de Plastoquinonas en estado reducido se estimó de la cinética de la fluorescencia (Gorkom, 1986; Horton y Boyer, 1990), según las siguientes condiciones:

1. Tilacoide aislado: Se aislaron tilacoides de plantas de 30 días según el método de Percival y Baker, 1985 y Habash y Baker, 1990, el cual se describirá más adelante. Los tilacoides fueron ajustados a 10 µg de clorofila/ml, en un medio conteniendo 100 mM de Sorbitol, 5 mM MgCl₂, 10mM de NaCl , 15 mM de Tricina, ajustado a un pH de 7.8 para después ser incubados a la oscuridad a 4°C, por lo menos 1 hora. La inducción de la fluorescencia se realizó en una cubeta de 1 ml con agitación continua y temperatura controlada a 30°C (Hansatech). La suspensión de tilacoides fue iluminada con una luz actínica roja (660 nm) con una intensidad de 900 µmol/m².seg (LC1-Hansatech). y la fluorescencia fue registrada en tiempo real de 0.6 segundos por un fluorómetro de grabación transitoria (TRS1-Hanstech), equipado con un detector con filtro de corte de 685 nm. Inmediatamente después de registrada la cinética "sin inhibidor", se agregó a la muestra DCMU (3-(3-4-diclorofenil)-1,1 dimetilurea) ajustando la concentración a 20 µM y

se incubó a la oscuridad por 30 minutos a 30°C. Transcurrido el tiempo se obtuvo la cinética "con inhibidor" utilizando el mismo protocolo de inducción de fluorescencia.

La poza de Quinona A se obtuvo del área sobre la curva de las cinéticas "con inhibidor" y las pozas de plastoquinonas se obtuvieron del área sobre la curva de las cinéticas "sin inhibidor".

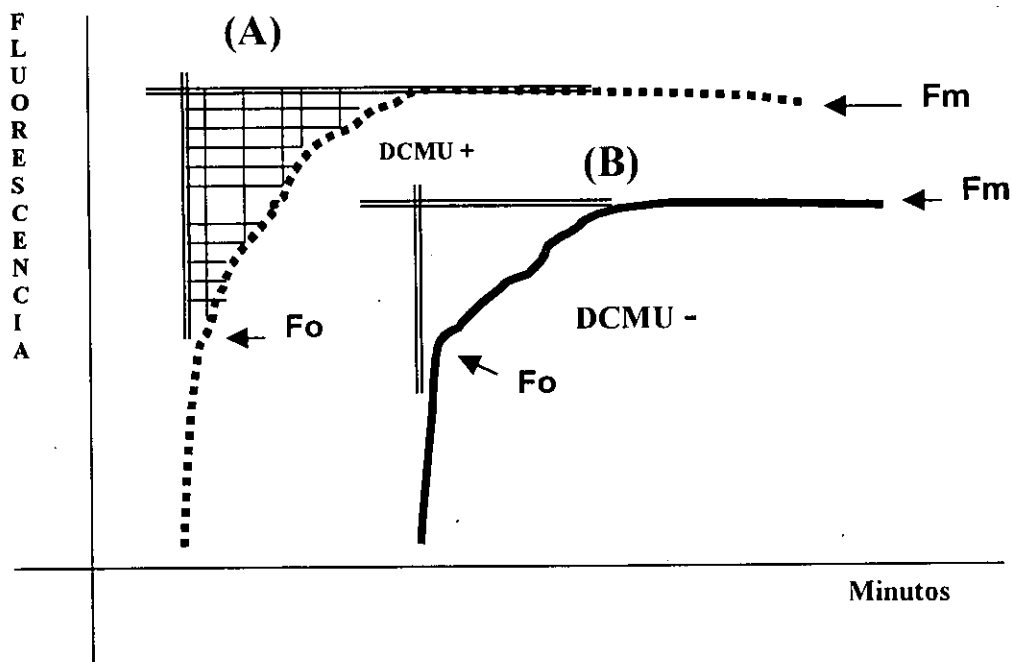


Figura 4

Inducción de fluorescencia en tilacoide aislado. (A) En presencia de DCMU para la obtención del número de centros de reacción o pool de QA. (B) Sin DCMU para la obtención del pool de Plastoquinona

C. Análisis del decaimiento de la fluorescencia *in vivo* :

El decaimiento de la fluorescencia *in vivo* se midió en hojas de plantas de 28 días de crecimiento. Las plantas fueron transportadas al laboratorio a las 9:00 hrs. y preacondicionadas durante 1 a 3 hrs a una densidad de flujo fotónico de $3 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{seg}$ a 28°C . La fluorescencia fue registrada en un fluorómetro modulado (MFMS-Hansatech). Se utilizó para todos los tratamientos la segunda hoja de cada planta ($n=3$). La inducción se llevó a cabo utilizando una luz modulada (870hz) de baja intensidad ($3 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{seg}$), con la cual se obtuvo la fluorescencia mínima (F_0) después de 1 minuto de estabilización, inmediatamente a esta señal se sobrepuso un pulso de 0.8 seg de luz blanca saturante $8000 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{seg}$., con la cual se obtuvo el valor de F_m . El estado estacionario de la fluorescencia se registró utilizando una fuente de luz blanca a $1000 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{seg}$. (LS2-Hansatech), modificando la intensidad de flujo con filtros neutros (Hansatech). Para cada intensidad se utilizó una planta diferente ($n=3$). Una vez obtenido el estado estacionario (10 minutos de inducción), se dió un pulso de 0.8 seg de luz blanca saturante $8000 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{seg}$., para obtener el valor de F_m^* . La fluorescencia en estado estacionario (F_s) fue registrada 1 minuto después del pulso

saturante, cuando la señal era estable. El valor de la fluorescencia mínima en estado estacionario, F_o^* , fue registrada como el valor más bajo de la fluorescencia obtenido inmediatamente después de apagar la luz actínica (Horton y Boyer, 1990). El valor del decaimiento fotoquímico (qP) y No-fotoquímico (qNP), se obtuvieron según las siguientes formulas:

$$qP = \frac{(Fm^* - Fs^*)}{(Fm^* - Fo^*)}$$

$$qNP = \frac{(Fm^* - Fo^*)}{(Fm - Fo)}$$

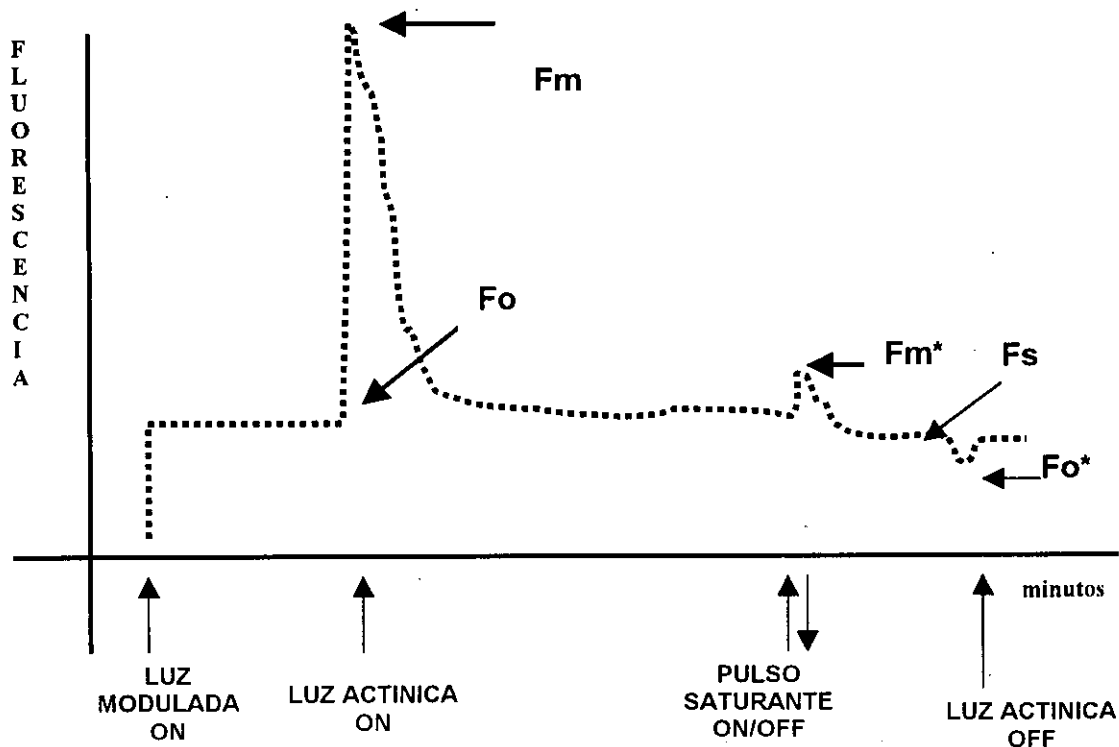


Figura 5
 Protocolo de inducción de la fluorescencia para la obtención de los valores de F_o , F_m , F_o^* , F_m^* y F_s

VI. Transporte de electrones en hoja intacta y tilacoide aislado (Hipkings y Baker, 1986).

A. Velocidad de separación de cargas en PSII (Strasser et al, 1995)

La velocidad de separación de cargas en el centro de reacción de PSII se midió indirectamente por los cambios en la velocidad de la cinética de la fluorescencia de plantas preacondicionadas a la oscuridad utilizando un medidor de fluorescencia portátil (PEA-Hansatech).

La velocidad de reducción de la Quinona "a" (Qa) se obtuvo de la pendiente entre el valor de la fluorescencia mínima F_0 (Fluorescencia emitida por transferencia de energía en los Complejos Antena de PSII "LHCII" antes del disparo de los electrones por los centros de reacción de P680) hasta el valor alcanzado en la primera inflexión denominada "J". La velocidad de reducción de QB se obtuvo de la pendiente entre "J" y la segunda inflexión denominada "I". La reducción completa de las Plastoquinonas se obtuvo de la pendiente entre "I" y el valor máximo de la fluorescencia, denominado "P", que en realidad es el valor de F_m . La metodología fue la siguiente:

Las plantas fueron trasladadas al laboratorio a las 9:00 hrs y fueron preacondicionadas durante 1 hr. a una DFF de $3 \mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{seg}$ a

B. Transporte electrónico en tilacoide aislado

1. Aislamiento de Tilacoides: Los tilacoides fueron aislados según el método de Percival y Baker, 1985; Hasbash y Baker, 1990). La metodología fue la siguiente:
 - a. Las plantas fueron transportadas a las 9:00 hrs al laboratorio e inmediatamente se obtuvo por cada tratamiento 20 gramos de tejido foliar fresco tomando de 3 unidades experimentales crecidas en alta densidad.
 - b. Las muestras fueron cortadas en pedazos pequeños y mezcladas en una proporción 1:5 con un medio de homogenización a punto de nieve el cual contenía 330 mM de Sorbitol, 10mM de $MgCl_2$, 5mM de Hepes (ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico)), 0.1 % de BSA (albumina de suero de bovino) ajustado a un pH de 7.6 con KOH. La mezcla fue inmediatamente homogenizada en una licuadora común (Moulinex) dando pulsos de 5 segundos , con 5 segundos de reposo hasta completar 4 ciclos, siendo el tiempo total de homogenización de 20 segundos.
 - c. El homogenizado fue filtrado en frío utilizando 8 capas de gasa y una intermedia de algodón.

- d. El filtrado se centrifugó a 6,000 rpm. durante 9 segundos a 2°C. La pastilla se resuspendió en frío con un pincel utilizando 2 ml de un medio de resuspensión conteniendo 100mM de Sorbitol, 10mM de NaCl, 5mM de MgCl₂ y 5 mM de Hepes, ajustado a pH 7.6 con KOH.
- e. La pastilla resuspendida se aforó a 40 ml con el medio de resuspensión y se centrifugó a 6,000 rpm. durante 5 minutos a 2°C. La pastilla de la segunda centrifugación se resuspendió en 2 ml. del medio de resuspensión utilizando un pincel. La muestra de tilacoides se ajustó a 1 mg de clorofila/ml con el mismo medio y se mantuvo en la oscuridad en una cama de hielo hasta su posterior uso.
2. Medición del acarreo electrónico en tilacoide aislado (Allen y Holmes, 1986): El acarreo electrónico desacoplado en los tilacoides aislados fue medido en un oxígrafo (Gilson), a una temperatura de 30°C y una DFF de 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{seg}$. El transporte de electrones en la cadena completa desde el agua hasta el fotosistema I (Flujo acíclico), se midió utilizando como aceptor final de electrones Metil Viologeno (100 μM concentración final). El transporte a nivel del fotosistema I desde el complejo citocromo b/f hasta el metil

viologeno se midió inhibiendo el fotosistema II con DCMU (10 μ M concentración final) y restituyendo el flujo de electrones a nivel del complejo Citocromo b/f con ácido ascórbico (1mM concentración final) y DCPIP (2,6 Diclorofenol-indofenol) (100 μ M concentración final). El transporte de electrones se midió utilizando un medio de reacción que contenía 100mM de Sorbitol, 5mM de NaCl, 5mM de $MgCl_2$, 5mM de Azida de Sodio y 50mM de Hepes ajustado a pH 7.6 con KOH.

VII. Liberación de oxígeno dependiente de la fijación de bióxido de carbono (Walker, 1987).

La liberación de oxígeno *in vivo* se midió en una cámara (DW2-Hansatech), la cual incorpora un electrodo de oxígeno para fase gaseosa. La temperatura de los ensayos se mantuvo constante a 30°C a través de un baño de agua circulante. Las muestras fueron iluminadas con una fuente de luz actínica (LS2-Hansatech), a 100, 200 y 500 μ mol/m².seg. utilizando filtros neutros de corte (Hansatech). La fuente de CO₂ se incorporó a través de una mezcla de carbonato y bicarbonato de sodio 1 M.

Las plantas fueron transportadas al laboratorio a las 9: 00 hrs. y preacondicionadas durante 1 hr. a una densidad de flujo fotónico de 3

$\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{seg}$. Para cada tratamiento se utilizó la segunda y tercera hoja de cada planta según el tratamiento ($n=3$), con las cuales se formó un tapete foliar de 10 cm^2 uniendo 5 hojas con una cinta adhesiva porosa (Walker, 1987). La velocidad (pendiente) de liberación de oxígeno para cada DFF se midió durante 2 minutos, para después incrementar la intensidad lumínica en la misma muestra.

VIII. Cuantificación de Clorofila (Hipkings y Baker, 1986).

A. Cuantificación en tilacoide aislado:

1. Los tilacoides se aislaron según el método antes descrito y de estos se tomó una muestra de $100 \mu\text{l}$ por tratamiento ($n=3$), la cual se mezcló vigorosamente con 10 ml de acetona al 80% en un tubo de ensayo cubierto. La mezcla se centrifugó a 3500 rpm . durante 5 minutos en una centrifuga clínica. El sobrenadante se aforó a 10 ml con acetona al 80%.
2. Las muestras aforadas se leyeron en un espectrofotómetro de UV/visible (Shimadzu) a 663 nm y 645 nm de longitud de onda, utilizando acetona al 80% como blanco.
3. La concentración de clorofila por ml se cuantificó según las siguientes fórmulas:

Clorofila "a" = (12.7) (ABS 663) - (2.69) (ABS 645)

Clorofila "b" = (22.9) (ABS 645) - (4.68) (ABS 663)

Clorofila total = (20.2) (ABS 645) + (8.02) (ABS 663)

B. Cuantificación de clorofila por unidad de peso fresco o unidad de área foliar.

1. Se utilizaron plantas de 28 días a las cuales se les cortó la parte media de la segunda hoja por tratamiento (n=5) y se pesó en fresco, calculándose el área foliar por un método gavimétrico.
2. Las muestras por separado se depositaron en frascos de centelleo cubiertos y se les agregó acetona al 80%, un mililitro por cada mg de peso fresco, para después almacenarse durante 12 hrs a 4°C para permitir que la acetona penetrara los tejidos.
3. Transcurrido el tiempo los tejidos se maceraron bajo luz tenue en morteros de porcelana utilizando la misma acetona donde se habían almacenado.
4. El macerado se centrifugó a 4,000 rpm. durante 5 minutos en una centrífuga clínica. El sobrenadante se aforó con acetona al 80% a un volumen equivalente a 1 ml por cada mg de tejido fresco.

5. Se leyó la absorbancia a 663 y 645 nm de longitud de onda de cada una de las muestras aforadas en un espectro de U.V./Visible (Shimadzu), usando acetona al 80% como blanco.
6. La concentración de clorofila "a", "b" y total se cuantificó de acuerdo a las fórmulas antes descritas, ajustando los valores de concentración de clorofila en unidades de peso fresco y área foliar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN :

I. Efectos en el Crecimiento

A. Germinación.

Las altas concentraciones de sales inorgánicas en el suelo o en el medio de cultivo reducen el crecimiento de la mayoría de los cultivos de importancia agronómica dependiendo de: (1) El estado fenológico cuando fue impuesto el estrés; (2) Los mecanismos de tolerancia o evasión que presente la especie; (3) El tipo de sal o sales presentes en el medio (Mozafar y Goodin, 1986).

La mayoría de los autores concuerdan en que son tres los factores adversos asociados con los medios salinos: a) Estrés osmótico, producto de un potencial hídrico más negativo del medio circundante a la raíz; b) toxicidad iónica específica, usualmente asociada con la excesiva toma de algún ion; c) imbalance nutritivo ésto es, cuando el exceso de un ion provoca la reducción de la absorción interna de uno u otro ion (Gorham, *et al.*, 1985).

La inhibición de la germinación por la salinidad de los suelos es el factor que más impide la introducción de los cultivos de interés agronómico en zonas salinizadas (Begun, *et al.*, 1992). Debido a ésto, algunos investigadores han clasificado la tolerancia a la salinidad en

las especies de acuerdo a su capacidad de germinación en los suelos salinos; sin embargo el efecto de la salinidad en la germinación es un buen parámetro cuando se comparan cultivares de una misma especie (Tal, 1985), ya que la tolerancia a un tipo de sal y/o concentración dada durante la germinación no es siempre acompañada de una tolerancia en las demás etapas fenológicas de la planta (Zsoldos, *et al.*, 1990 ; Mozafar y Goodin, 1986). Por otro lado, Ungor, en 1996 menciona que para el caso de plantas halófitas, la tolerancia en la germinación es de 10 a 100 veces más sensible que durante etapas posteriores de crecimiento.

Como ha sido reportado para otros cultivares de *Triticum aestivum* (Mozafar y Goodin, 1986; Begun, *et al.*, 1992), los resultados encontrados en esta investigación muestran que el porcentaje de germinación en el cultivar "Pavón" disminuye conforme aumenta la concentración de NaCl en el medio (Figura 7). Concentraciones menores a 50 mM de NaCl en el medio no tienen efecto inhibitorio en la germinación de cultivar "Pavón", este dato corrobora lo encontrado por Begun, *et al.*, en 1992, para el cultivar tolerante "Akbar". De la misma manera, la longitud del hipocótilo y la raíz disminuyen conforme aumenta la concentración de NaCl en el medio (Figura 8) .

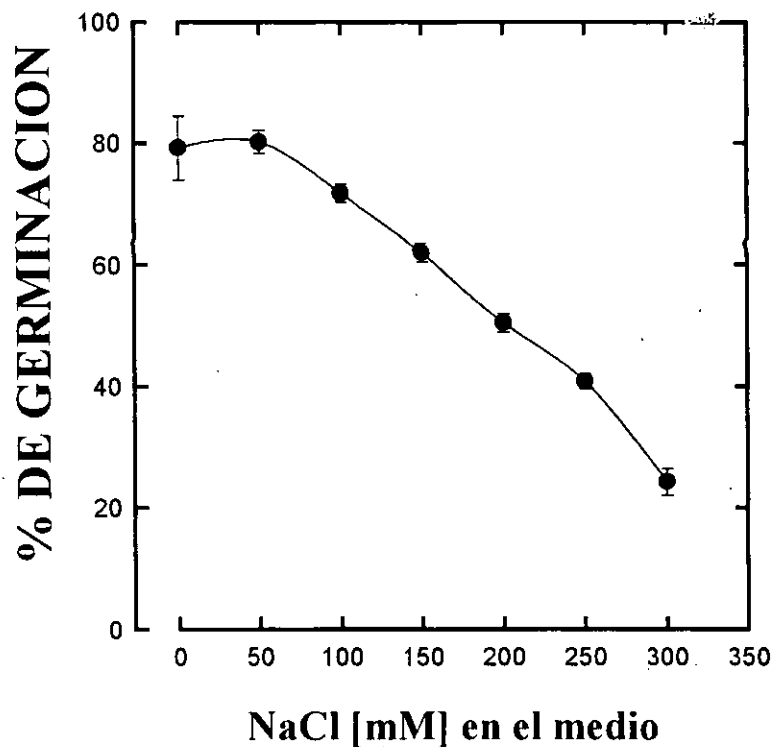


FIGURA 7

Efecto del cloruro de sodio en la germinación de *Triticum aestivum* cv. Pavón. Germinación a la oscuridad en cámara húmeda (80% H.R.) a 30°C durante 144 hrs. n=5.

Mozafar y Goodin, en 1986, trabajando con un cultivar tolerante a estrés hídrico "Sturdy", reportan que la reducción de la germinación por la salinidad se debe tanto al estrés osmótico del medio, así como a la toxicidad iónica, sin embargo estos autores mencionan que la disminución del crecimiento de la raíz e hipocotilo esta más

correlacionada con la presión osmótica del medio. Begun, *et al*, en 1992, reportan que la inhibición de la germinación en trigo es producto de una acumulación excesiva de sodio y cloro en la radícula y plúmula, siendo el cloro el más tóxico. Weimberg, en 1987, menciona que el trigo es más tolerante durante la germinación y más sensible durante el período de plántula (Figura 8).

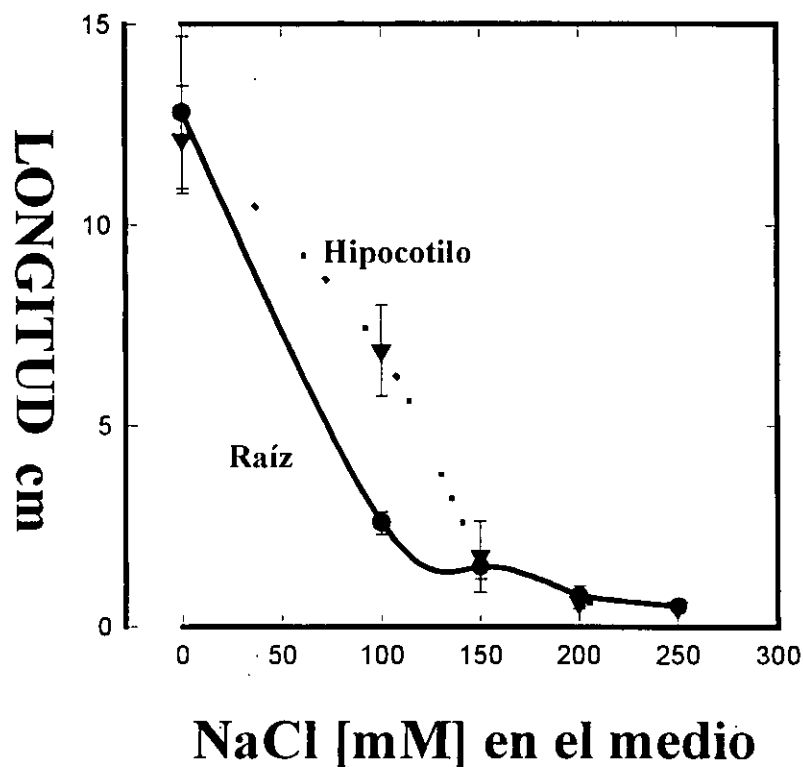


FIGURA 8

Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de la raíz ● ---● e hipocotilo ▼ - - ▼ de plántulas de *Triticum aestivum* c.v Pavón, creciendo a la oscuridad durante 7 días en una cámara húmeda. n=5

Los resultados de esta investigación demuestran que el cultivar "Pavón" disminuye su germinación en un 50% cuando es expuesto a 200 mM de NaCl, sin embargo, a diferencia de otras especies tolerantes en la germinación y sensibles en la etapa vegetativa y reproductiva, el cultivar "Pavón" es capaz de completar su fase vegetativa y reproductiva con llenado de grano a esta misma concentración de cloruro de sodio en el medio de cultivo (datos no reportados). Si se comparan estos resultados con los datos encontrados en el cultivar "Akbar", reportado como "tolerante" y en el cual se ha encontrado que su germinación disminuye en un 50% a 325 mM de NaCl (Begun, *et al.*, 1992), podemos clasificar al cultivar "Pavón" como un trigo hexaploide "medianamente tolerante" al estrés salino con NaCl durante la etapa de germinación.

B. Desarrollo Vegetativo

1. Crecimiento del Vástago

Se ha reportado que las plantas de *Triticum aestivum* son más sensibles en la etapa vegetativa que en la reproductiva (Botella, *et al.*, 1993). En esta investigación, realizada durante la etapa vegetativa, se encontró que para la variedad "Pavón" el incremento de peso seco y

fresco del vástago disminuye significativamente conforme se aumenta la concentración de NaCl en el medio de cultivo (Tabla 1).

A los 28 días después de la siembra, las plantas crecidas en 150 mM de NaCl alcanzan solo el 43% del crecimiento de las plantas control (medido en peso seco), sin embargo, aun cuando se da esta reducción tan drástica del crecimiento, las plantas crecidas en 75 mM de NaCl no presentan diferencias significativas con las plantas control.

En un estudio hecho con la variedad tolerante de *T. aestivum* "Kharchia", Munns, *et al.*, en 1995, reportan un crecimiento del 40% con respecto al control después de 30 días de estar expuestas a 150mM de NaCl .

CRECIMIENTO DEL VASTAGO		
NaCl mM	Peso Fresco (g/planta)	Peso Seco (g/planta)
0	1.396 ± 0.205	0.2364 ± 0.034
75	1.303 ± 0.233	0.2135 ± 0.046
150	0.664 ± 0.073	0.1013 ± 0.012

Tabla 1

Efecto del Cloruro de Sodio en la ganancia de peso fresco y peso seco por el vástago de *Triticum aestivum* cv. Pavón 28 días después de la siembra en los diferentes tratamientos.

Por otro lado, Duran y Lacan (1994), apuntan que los trigos hexaploides son capaces de controlar la entrada de sodio, cuando son expuestos a concentraciones bajas de NaCl (10-50 mM), pero cuando se rebasan estas concentraciones la planta empieza a acumular sodio y cloro intracelularmente, hasta alcanzar concentraciones que resultan tóxicas para su crecimiento. Kingsbury y Epstein en 1986, trabajando con una línea sensible y otra tolerante de *Triticum aestivum* encontraron que es el sodio y no el cloro los que al acumularse tiene efectos negativos sobre el crecimiento de las plantas salinizadas.

Es importante notar que la relación de peso fresco/peso seco se mantiene en todos los tratamientos y aún en la concentración más alta de NaCl (150 mM), es un 12% más elevada, lo que indica que la salinidad induce una cierta succulencia, algo similar fue reportado para otras glicófitas tolerantes (Longstreth y Nobel, 1979). Match, *et al.*, en 1988, en sus investigaciones con *Phragmites communis*, una planta halófitas, reportan que el mecanismo de tolerancia de esta planta incluye tres factores: (1) excluir eficientemente el sodio, (2) mantener altos los niveles del potasio celular y (3) tolerar el deshidratamiento celular.

Los resultados de esta investigación indican que *T. aestivum* cv. Pavón, es capaz de mantener bajos los niveles de sodio en el vástago, incrementar los niveles de potasio al encontrarse bajo estrés salino y en estas condiciones mantener una buena turgencia celular. Es pues factible que estas características sean parte del mecanismo de esta planta para tolerar la salinidad.

2. Crecimiento Radicular

El crecimiento radicular de *Triticum aestivum* cv. "Pavón" a 75 y 150 mM de NaCl durante 28 días (Tabla 2) provoca una disminución

CRECIMIENTO DE RAIZ		
NaCl mM	Peso Fresco (g/planta)	Peso Seco (g/planta)
0	0.745 ± 0.11	0.0849 ± 0.011
75	0.445 ± 0.06	0.0488 ± 0.005
150	0.432 ± 0.07	0.0443 ± 0.004

Tabla 1

Efecto del Cloruro de Sodio en la ganancia de peso fresco y peso seco por la raíz de *Triticum aestivum* cv. Pavón 28 días después de la siembra en los diferentes tratamientos.

en la ganancia de peso seco radicular hasta del 47% en el tratamiento a 150 mM. Kafkafi y Bernstein, 1996, mencionan que la salinidad en el medio de crecimiento causa una disminución del potencial hídrico

provocando una caída de la turgencia de las células radiculares. El reinicio del crecimiento se da cuando las células se ajustan osmóticamente. En el presente estudio la salinización se inició desde la germinación, por lo que la planta debió ajustarse osmóticamente desde el inicio para poder crecer. Por otro lado, Cheesman, en 1988, menciona que en algunas plantas donde la salinidad inhibe el crecimiento del vástago no lo hace en la raíz por lo que frecuentemente se observa una disminución de la relación vástago/raíz. En esta investigación el crecimiento radicular en ambos tratamientos es inhibido, sin embargo el crecimiento del vástago solo se inhibe a la concentración de 150 mM de NaCl, por lo que la relación disminuye ligeramente a 150 mM de NaCl (15%) y a 75 mM de NaCl aumenta en un 57%.

Las diferencias encontradas en el crecimiento, al parecer están dadas por una diferencia en la acumulación de iones sodio en los diferentes órganos. Como se puede observar en los datos el crecimiento radicular y foliar existe una inhibición del crecimiento cuando las concentraciones de sodio rebasan un rango de 400 a 500 $\mu\text{moles/g PS. de Na}^+$ (Tabla 4 y Figura 9); siendo el caso para la raíz en el tratamiento de 75 mM y 150 mM y para el vástago en el

tratamiento de 150 mM. Sin embargo esta relación no es lineal, ya que mayor acumulación de sodio no causa una reducción mayor de la raíz, para el caso del tratamiento de 150 mM.

La inhibición del crecimiento de la raíz por la salinidad, apunta Kafkafi y Bernstein en 1996, reduce el volúmen de suelo explorado por la misma y por tanto también reduce la capacidad de toma de agua y nutrientes. Esta disminución de aportación de elementos nutricionales al vástago pudiera reducir su crecimiento. Es evidente que en estudios controlados, como el presente, la exploración del suelo no es un problema, pero lo que se quiere apuntar es que la disminución del crecimiento del vástago no está asociada a una pérdida de la funcionalidad o la capacidad de la raíz, sino a una toxicidad iónica.

Mozafar y Goodin, en 1996, trabajando con el cultivar TAM-W-101, reportado como tolerante al estrés hídrico, encontraron que el crecimiento de la raíz es más sensible a la salinidad que el crecimiento del hipocotilo. De manera similar, en este trabajo se encontró que el crecimiento de la raíz es más sensible.

3. Crecimiento Foliar

El crecimiento foliar de muchas especies es severamente inhibido por altas concentraciones de NaCl en el medio de crecimiento

radicular. El mecanismo fisiológico que causa la inhibición del crecimiento no está completamente entendido. Cambios en el potencial hídrico de la hoja, la disponibilidad energética o la cantidad específica de ciertos nutrientes posiblemente sean algunas de las causas que tomen parte en el proceso de inhibición del crecimiento. (Bernstein, *et al.*, 1995).

La reducción del área foliar tiene efectos directos en el potencial fotosintético de la planta, y por ende, en la producción final del cultivo (Neuman, *et al.*, 1988). El cultivar "Pavón" crecido desde semilla a 150 mM de NaCl disminuye significativamente el área foliar hasta en un 28% comparado con el control (Tabla 3), sin embargo, las plantas crecidas bajo las mismas condiciones pero a 75 mM de NaCl, no presentan diferencias significativas comparadas con el control.

Si examinamos la ganancia final de peso seco de la planta y lo dividimos por el área foliar final en nuestro experimento, se encontrará que la ganancia de peso seco por unidad de área foliar disminuye conforme aumenta la salinidad, lo que nos indica que la disminución en la acumulación de materia seca no está dada por un efecto de disminución de talla y área foliar de manera proporcional, sino que

existe una disminución en la ganancia de peso seco por unidad de área foliar producto del estrés salino.

ÁREA FOLIAR	
NaCl mM	cm ² /planta
0	56.120 ± 9.329
75	55.495 ± 3.851
150	39.538 ± 6.610

Tabla 3

Efecto de la salinidad sobre el crecimiento foliar de *Triticum aestivum* cv. Pavón, 28 días después de la siembra en cada uno de los tratamientos.

Gale y Zeroni, 1988, mencionan que los mecanismos de adaptación al estrés salino requieren gastos de fotosintetatos asimilados, de esta manera, la cantidad disponible para el crecimiento normal (expresado en incremento de peso seco) se ve reducido. Yeo, en 1983, apunta que estos gastos de adaptación son, de manera general: el mantenimiento de gradientes iónicos y el ajuste osmótico celular a través de la producción de osmolitos orgánicos cito-compatibles; el desvío de energía o materia prima para mantener estos mecanismos a costo del crecimiento normal, lo cual desde el punto de vista agronómico, tiene efectos adversos en la producción final del cultivo.

Por otro lado, el hecho de una disminución del peso seco por unidad de área foliar presente, indica que la salinidad también pudo afectar la asimilación de bióxido de carbono para su posterior conversión en materia seca.

II. Efectos en el Contenido Iónico

A. Distribución Catiónica

El crecimiento de un cultivo, generalmente expresado en el rendimiento o en la biomasa, puede ser adversamente afectado por desordenes que resultan de imbalances o deficiencias nutricionales.

La salinidad interrumpe la adquisición de nutrientes minerales en las glicófitas de dos maneras: (1) la fuerza iónica del sustrato puede tener efectos directos en la toma y translocación de los nutrientes; (2) la concentración elevada de las sales en el sustrato puede provocar una competencia en la absorción de otros nutrimentos necesarios para la planta (Grattan y Grieve, 1994).

En diversos estudios realizados con plantas halófitas y no halófitas, se han encontrado los siguientes comportamientos (Porjaff-Mayer y Lenner, 1994):

(1) Habilidad para acumular o excluir selectivamente los iones del medio.

- (2) Control en la captación iónica por la raíz y control del transporte iónico hacia el vástago.
- (3) Selectividad en el transporte xilemático.
- (4) Participación osmoreguladora de los iones acumulados.
- (5) Compartimentación de los iones a nivel celular y de toda la planta.
- (6) Acumulación de los llamados compuestos compatibles y su papel en funciones osmoreguladoras y osmoprotectoras

Resumiendo lo anterior, pareciera ser que en la naturaleza se fijaron dos mecanismos diferentes para la tolerancia a la salinidad : (1) plantas capaces de usar el Na^+ y Cl^- como solutos de ajuste osmótico, aun cuando pudieran ser potencialmente tóxicos. (2) plantas que excluyen los iones, pero sintetizan productos orgánicos como respuesta de ajuste osmótico celular.

La evidencia indica que las plantas combinan ambos mecanismos, ya que se ha comprobado que la actividad de la mayoría de las enzimas de plantas halófitas que acumulan sal son tan sensibles a altas concentraciones de sales como las enzimas de las plantas glicófitas sensibles a la salinidad, por lo cual se piensa que las plantas que acumulan sales como mecanismo de ajuste osmótico las compartimentan y sintetizan compuestos orgánicos compatibles

con la actividad celular citoplasmática, los cuales permiten el ajuste osmótico interno (vacuola-citoplama) y externo (citoplasma-apoplasto). (Magdy, *et al.*, 1993; Weimberg, 1937).

La acumulación selectiva de potasio como respuesta a la salinidad, también se le ha relacionado como un mecanismo de ajuste osmótico (Kramer, 1984). Por otro lado, las sales acumuladas pueden ser translocadas y acumuladas selectivamente en las partes más adultas de las plantas o las hojas senescentes, de tal manera que las partes más jóvenes que están en crecimiento no se ven afectadas por las altas concentraciones de iones (Bernstein, *et al.*, 1995).

Las plantas que excluyen la entrada de los iones, poseen mecanismos que les aseguran baja acumulación de estos en el vástago. Esto al parecer está relacionado con una eficiente selectividad hacia el potasio. Otra posibilidad es que el sodio sea absorbido en cantidades significativas por la raíz, pero reabsorbido en las partes proximales de la raíz o del tallo y retraslocado al suelo o acumulado en la raíz (Davenport, Reid y Smith, 1997).

La distribución de cationes en el cultivar "Pavón" a los 30 días de salinización después de la siembra, muestra de manera general, para

todos los órganos un aumento de la concentración de sodio, potasio y una disminución de calcio y magnesio por gramo de tejido seco.

Para dar fluidez a la discusión de los resultados, se analizará la distribución catiónica a nivel de cada órgano:

1. Contenido catiónico en raíz.

En términos generales, el crecimiento de la planta en un medio salino provoca la acumulación de sodio y potasio y la pérdida de calcio y magnesio en la raíz (Tabla 4).

DISTRIBUCION CATIÓNICA EN RAÍZ (mmoles/g peso seco)				
NaCl mM	Sodio	Potasio	Calcio	Magnesio
0	0.399 ± .065	0.119 ± .007	0.086 ± .014	0.035 ± .002
75	0.714 ± .034	0.144 ± .009	0.056 ± .004	0.038 ± .001
150	1.045 ± .023	0.233 ± .034	0.056 ± .002	0.024 ± .002

Tabla 4

Efecto del Cloruro de Sodio en la acumulación de cationes a nivel radicular en *Triticum aestivum* cv Pavón a los 30 días después de la siembra en cada uno de los tratamientos.

En los tratamientos de 75 y 150 mM de NaCl a los 30 días de crecimiento el sodio se acumula con respecto al control en un 27 y 160% respectivamente, siendo evidente que la acumulación de sodio no es lineal con la concentración de Na⁺ en el medio. Es interesante observar que el aumento de sodio en la raíz en el tratamiento a 75

mM, es proporcional al aumento de potasio, siendo este 27 % y 21 % con respecto al control (Tabla 4). Sin embargo, esta proporcionalidad es ampliamente superada al exponer las plantas a 150 mM de NaCl en el medio de cultivo en donde se acumula un 160% de sodio y 95% de potasio con respecto al control. Lo anterior reafirma el comentario de que los trigos modernos hexaploides que contienen el genoma "D", tienen una alta selectividad por el potasio a nivel radicular, no siendo el caso para los trigos amfiploides con genomas A y B (Shah, *et al.*, 1987; Gorhama, J, 1994). Sin embargo, como también ya se describió, la selectividad está dada en un cierto rango de salinidad, el cual al ser rebasado la planta pierde esta capacidad (Gorham, *et al.*, 1990). Este rango ha sido reportado para las especies de trigo moderno hexaploide *Triticum aestivum* entre 0 y 50 mM, lo cual se comprueba en los resultados obtenidos con el cultivar "Pavón" (Begun, *et al.*, 1992).

La superior acumulación de sodio en el tratamiento de 150 mM no es debido a la pérdida de integridad de la membrana radicular sino a la pérdida de selectividad entre K^+/Na^+ que al parecer no están asociadas. La pérdida de integridad de la membrana radicular está asociada a una pérdida citosólica de potasio (Kafkafi y Berstein, 1996).

Los resultados de esta investigación indican una ganancia de 95% de potasio con respecto al control en el tratamiento a 150mM NaCl, siendo ésta evidencia de la integridad de la membrana. Datos similares fueron encontrados por Salama, *et al.*, en 1994. Estos investigadores reportan un incremento similar de sodio y potasio en la raíz, hasta que la concentración de sodio en el medio de crecimiento rebasa los 100 mM. En este momento el transporte de potasio no aumenta pero sigue siendo superior al control.

Por otro lado, la pérdida de selectividad ha sido relacionada a la pérdida de calcio de la membrana (Gorham y Bridges, 1995). Kinraide, en 1999, encontró que en plántulas de trigo estresadas a 130 mM de NaCl, el sodio desplaza al calcio de la superficie de la membrana celular. Esta pérdida tiene efectos en la correcta compartimentalización del sodio, el cual alcanza concentraciones tóxicas en el citoplasma de las células radiculares. Davenport, *et al.*, en 1997, reporta que el calcio puede aminorar el efecto de la toxicidad iónica. El calcio disminuye la toma pasiva de sodio a través del plasmalema, lo cual, al parecer, sucede a través de un canal de potasio no específico.

Es importante hacer notar que el medio de cultivo utilizado en esta investigación, solución Hoagland, contiene una concentración de 3.5 mM de Calcio, concentración máxima usada en los experimentos hechos por Davenport, *et al*, en 1997,

En esta investigación el contenido de calcio radicular disminuye en ambos tratamientos en un 34.4% con respecto al control. Cramer, *et al*, 1985, encontraron en sus estudios con plantas de algodón, que la salinidad provoca un desplazamiento de calcio asociado a la membrana de las células radiculares, lo que daba como resultado un incremento de la permeabilidad de la membrana y la pérdida de la selectividad entre la absorción de sodio y potasio. Estos mismos autores encuentran que la adición de 10 mM de calcio al medio restablece la impermeabilidad de la membrana e impide la pérdida de potasio. Suhayda, *et al.*, en 1992, trabajando con cultivares de cebada sensibles y tolerantes a la salinidad, encontraron que los tolerantes mantenían una mayor concentración de calcio en el tejido, dando como resultado un mayor control de la toma de sodio, comparado con los sensibles, lo cual demuestra la participación del calcio en el mantenimiento de la selectividad en la toma de potasio sobre sodio.

Lo anterior demuestra que ni la pérdida de integridad, medida por la salida masiva de potasio, ni la pérdida de calcio por parte de la plarita, medida en peso seco de raíz, son responsables directas de la pérdida de selectividad entre los tratamientos de 75 a 150 mM, ya que en ambos el potasio se acumula y el sodio aumenta, pero el calcio se pierde en la misma magnitud.

Por otro lado, es ampliamente reconocido que el calcio se distribuye mayormente en la pared y en mucho menor cantidad en la membrana celular y el citosol (Davenport, *et al.*, 1997). El calcio en pared celular tiene la función de mantener la integridad de la pared al formar puentes con los materiales cementantes de la misma y a través de ésto confiere estabilidad a las fibras de celulosa y pectina. Se reconoce también que el calcio establece interacciones iónicas con los fosfolípidos y proteínas de la membrana celular, lo cual da como resultado una estabilidad estructural y funcional del plasmalema (Marschner, 1986).

Lo anterior es importante puntualizarlo, debido a que el transporté de solutos desde el suelo hasta el vástago por un lado está mediado por el plasmalema de las células epidérmicas de la raíz y, en cierto grado, por las células corticales del mismo órgano. Las células

epidérmicas están comunicadas unas con otras a través de los plasmodesmos, formando la vía del *simplasto*, la cual provee de una ruta altamente selectiva en el transporte de la raíz. La entrada al *simplasto*, y en cierto grado la liberación en el xilema, es controlada por el transporte a nivel de la membrana celular. El *simplasto* es también parte de la vía de flujo de agua a través de la raíz. Por otro lado, las paredes celulares forman otra vía por medio de la cual el agua puede fluir llevando consigo solutos de la solución externa. Esta vía no selectiva es denominada *apoplástica*. Existen barreras a la difusión en la vía del *apoplasto*, las cuales se localizan en la endodermis de las células radicales; una son las bandas de Caspári y otra son las suberizaciones de las paredes de la misma endodermis, lo cual restringe el flujo no selectivo de solutos. Una vez cruzando estas barreras, los solutos en el estele pueden ser liberados al *simplasto* y de ahí al xilema o directamente vía las células de transferencia (Marschner, 1985).

Por lo anterior, entendemos que para mantener la selectividad de transporte iónico a nivel de la raíz, se requiere de la estabilidad tanto del plasmalema como de la pared celular (Kafkafi y Bernstein, 1996), por lo cual, es posible, como ya se ha mencionado, que este

incremento de sodio sobre potasio a niveles altos de salinización (150 mM NaCl), se deba a una pérdida en la selectividad en la toma del Na⁺ y el K⁺, y en este evento pudieran estar involucrados tanto las paredes y la membrana como rutas de transporte de solutos.

La tolerancia a la salinidad en trigo esta correlacionada con la concentración de sodio acumulada en el vástago (Davenport, Reid, Smith, 1997; García, *et al.*, 1997), por lo tanto las especies que excluyen al sodio con mayor efectividad son más tolerantes (Schatman, *et al.*, 1991; Gorham, J. 1994). En los resultados de este experimento, gran parte del total de sodio acumulado (casi el 50%) se acumula en la raíz sin ascender al vástago. Davenport, *et al.*, en 1997, y Tyerman, *et al.*, en 1987, mencionan que la plantas pueden excluir el sodio del vástago impidiendo su translocación por la acumulación del ion sodio en las vacuolas de las células radiculares, en vez de permitir su transferencia a las células del xilema. Ptiman, *et al.*, en 1981, encontraron una relación mayor de potasio/sodio en la vacuola que en citoplasma.

En las condiciones de esta investigación, de la totalidad del sodio acumulado en la planta, gran parte permanece en la raíz,

posiblemente acumulándose en la vacuola para asegurar las funciones celulares de las células radiculares.

La cantidad de magnesio por gramo de tejido seco disminuye en un 30 % solo en el tratamiento de mayor concentración de NaCl (150 mM). Bernstein, *et al.*, en 1995, reportan que en sorgo la salinidad provoca una reducción de magnesio, sin embargo, Kingsbury, *et al.*, en 1984, encuentran que la salinidad en las líneas de *Triticum aestivum* PI 178704 (tolerante) y PI 94353 (sensible) provoca un incremento de magnesio en un factor de 23 en ambas líneas. En un estudio posterior, Kingsbury y Epstein, en 1986, utilizando la misma línea tolerante y PI 94341 como sensible encontraron que al ser salinizadas a 125 mM de NaCl la línea tolerante incrementa la concentración de magnesio en la raíz y la sensible lo pierde ligeramente.

Los resultados de esta investigación indican lo contrario a lo encontrado por Kingsbury, *et al.*, en 1984 y 1986. La posible diferencia de resultados pudiera estar en la forma en que fueron salinizados los trigos en estos experimentos. Las semillas fueron germinadas en Hoagland diluído 1/10 y paulatinamente se adicionó solución Hoagland

hasta alcanzar la concentración máxima. Una vez alcanzada ésta, se hizo lo mismo para el caso del sodio, según el diseño experimental.

En esta investigación, el trigo fue expuesto a las concentraciones de NaCl desde su germinación. Por tanto, los resultados pudieran estar dados por un intercambio del magnesio a nivel de la pared o de la membrana por sodio durante el crecimiento y los días que duró el tratamiento. Marschener, en 1985, menciona que el sodio puede competir con el magnesio en su absorción a nivel de la raíz. Romero, *et al.*, en 1994, encontraron que en plantas de *Melilotus segetalis* salinizadas el transporte de magnesio disminuye, comparado con el de potasio y calcio; sin embargo reportan que no observan clorosis en las hojas lo cual es signo de deficiencia de magnesio. Estos mismos autores reportan que la deficiencia de magnesio pudiera contribuir en la disminución del crecimiento de la planta cuando es sometida a estrés salino. Donovan, *et al.*, en 1997, mencionan que el mantenimiento de una concentración adecuada de magnesio en los tejidos es importante debido a que el magnesio es cofactor en la actividad de la ATPasa del tonoplasto, organelo crucial en la compartimentación de los iones; además que el magnesio es

necesario para la transducción de las proteínas en presencia de altas concentraciones de Na^+ .

La aparente pérdida de selectividad del cultivar "Pavón" crecido a 150 mM de sodio pudiera estar relacionada con una pérdida de magnesio, afectando funciones celulares, sobre todo las de compartimentalización, lo que provocaría un aumento de la concentración de sodio a niveles tóxicos en el citosol.

Jescke y Nassery, en 1981, trabajando con trigo, girasol y cebolla, encontraron a través del método de análisis de compartimentos, que en las células radiculares de las tres especies, el trigo tiene mayor flujo de sodio cuando el potasio está ausente. Al agregarse el potasio al medio, el trigo tiene el menor flujo de sodio y la menor concentración de sodio en el citoplasma y vacuola. Además de esto, el potasio induce la expulsión del sodio sólo en las células radiculares de trigo, indicando que el mecanismo de recambio Na^+-K^+ , a través del plasmalema, es altamente eficiente en esta especie. Estos autores concluyen que de la misma manera que lo encontrado en cebada, la selectividad del trigo al potasio por el sodio a nivel radicular está dada por: (1) una eficiente competencia entre el sodio y el potasio (2) por bombas de captación de potasio y de expulsión de sodio en la

membrana plasmática y (3) por un sistema que incorpora sodio del citoplasma a la vacuola, intercambiándolo por potasio.

2. Contenido cationico en vástago

De manera general la distribución catiónica en el vástago sigue el mismo patrón que el de la raíz. El sodio y el potasio se acumulan masivamente en el tallo y las hojas y de manera específica el calcio y el magnesio disminuyen en ambos órganos, siguiendo también un patrón que más adelante discutiremos.

El efecto de la salinidad en muchas plantas está determinado por la cantidad de ion que es incorporado por la planta, por la subsecuente distribución de este ion en la planta y por la interacción con otras características, como vigor o la eficiencia del uso del agua. De esta manera, aun cuando la cantidad del ion transportado revela las características del sistema radicular, es la concentración final del mismo en la hoja el responsable del daño. La pérdida de la productividad de la hoja da como resultado la disminución de la productividad de la planta (Yadav, *et al.*, 1996).

En trigo, la sensibilidad a la salinidad ha sido relacionada con la concentración de sodio en el vástago y la tolerancia se considera dependiente de la habilidad de la planta para excluir sodio del mismo

(Davenport, 1997). Se reconoce también que al crecer en altas concentraciones de NaCl, tanto el sodio y como cloro son acumulados, pero solo el sodio produce toxicidad en la planta cuando se acumula en altas concentraciones (Kingsbury y Epstein, 1986).

Los resultados de esta investigación muestran no sólo una selectividad entre el sodio y el potasio por parte de la raíz, como ya se ha indicado y se ha reportado para los trigos hexaploides (Gorhman, 1994), sino también una compartimentación del sodio a nivel radicular.

Como ya se mencionó, las vías de acceso de los iones a la planta son a través de las rutas *simplástica* y *apoplástica*. Por esta razón, la raíz juega un papel importante en la entrada y acumulación de iones en la planta (Jeschke y Nassery, 1998; Davenport, Reid y Smith 1997).

Los resultados indican que de la cantidad total de sodio acumulado en la planta, en los tratamientos a 75 y a 150 mM de NaCl, el 50% de este ion se acumula en la raíz y el resto (50%) entre el tallo y la hojas. Datos similares son encontrados por Kingsbury y Epstein, en 1986. Del total acumulado de sodio, 41% se encontró en el vástago y 59% en la raíz, para el caso de un cultivar sensible y el tolerante

acumuló 29% en vástago y 71% en la raíz. Salma, *et al.*, en 1994, trabajando con trigo, encontraron que tanto en la variedad tolerante "Kharchia" y en la sensible "T-79", el sodio se distribuye en un 50% en el vástago y un 50% en la raíz.

Por lo anterior, la raíz juega un papel importante en la cantidad de sodio acumulado en las hojas, el cual finalmente tendrá el efecto negativo en el crecimiento de la planta (Davenport, 1997).

3. Contenido cationico en tallo

A nivel del vástago, el tallo juega un papel importante en la acumulación de sodio en las hojas. En ambos tratamientos, 75 y 150 mM de NaCl, del total de sodio acumulado en la planta, solo el 50% se encuentra en el vástago y de esta cantidad poco menos de la mitad se acumula en el tallo, de tal forma que de la acumulación total de sodio, solo 30% se acumula en las hojas (Tabla 5).

Wolf, *et al.*, en 1991, reportan en sus experimentos con cebada, que el tallo tiene un papel importante en la distribución del sodio absorbido y translocado hacia el tejido foliar. El tallo distribuye mayor cantidad de sodio hacia los tejidos viejos y menor hacia los jóvenes de la planta.

DISTRIBUCION CATIONICA EN TALLO (mmoles/g peso seco)				
NaCl mM	Sodio	Potasio	Calcio	Magnesio
0	0.050 ± .007	0.681 ± .071	0.115 ± .004	0.021 ± .001
75	0.325 ± .031	0.857 ± .071	0.061 ± .004	0.017 ± .001
150	0.467 ± .024	0.964 ± .034	0.053 ± .004	0.013 ± .001

Tabla 5

Efecto del Cloruro de Sodio en la acumulación de cationes a nivel del Tallo a los 28 días después de la siembra en cada uno de los tratamientos.

Es importante analizar que del total de potasio acumulado, el 52% en ambos tratamientos esta acumulado en el tallo, lugar donde podría jugar un papel importante en la osmoregulación y reabsorción del sodio.

El calcio y el magnesio siguen el mismo patrón que la raíz, conforme aumenta la concentración de sodio en el tejido, estos cationes se pierden, sin embargo el comportamiento no es lineal con el estrés.

4. Contenido catiónico en hoja

Siguiendo la metodología de esta investigación, a los 30 días después de la siembra las plantas de *Triticum aestivum* cv. Pavón, sin importar el tratamiento, tenían cuatro hojas completamente desarrolladas. La numeración utilizada fue #4 para la hoja más joven

pero completamente abierta y #1 para la más adulta pero no senescente.

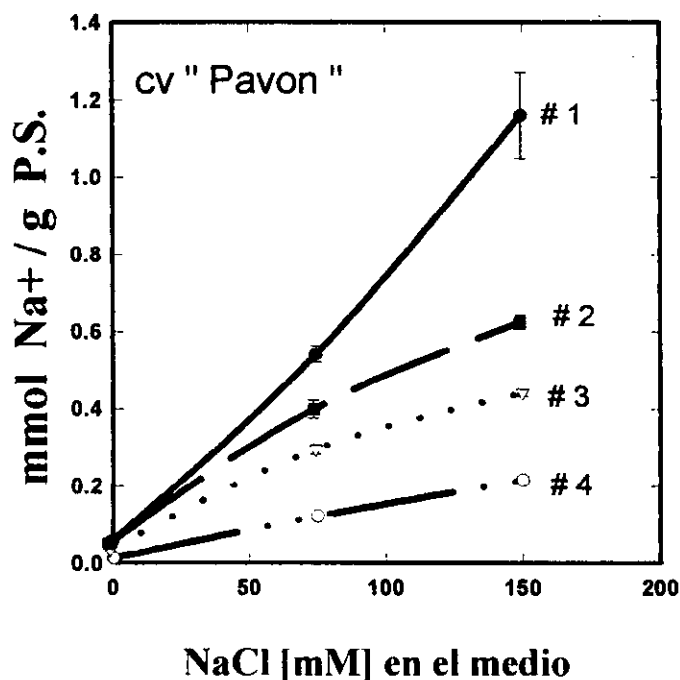


Figura 9

Efecto de la salinidad en el contenido de Na^+ en las hojas de *Triticum aestivum* cv. Pavón. Los números dentro de la gráfica (#) indican la edad de la hoja, siendo el valor más alto para la hoja más joven.

La distribución de los cationes en las hojas de las plantas de trigo en el tratamiento control fue variable. El sodio y el magnesio se encuentran en concentraciones similares en todas las hojas, sin importar la edad. El potasio es ligeramente mayor en las hojas más jóvenes y el calcio sigue un patrón marcado de concentración,

aumentando significativamente conforme envejece la hoja (Figuras 9-12). Weimberg, en 1987, encontró un patrón similar de distribución para el caso del potasio en plantas de trigo no salinizadas.

Para el caso de las plantas experimentales, el sodio aumentó en todas las hojas conforme aumentó el sodio en la solución nutritiva (Figura 9). El patrón de distribución del sodio fue similar en ambos tratamientos (75 y 150 mM de NaCl), aumenta significativamente en todos los casos conforme aumenta la edad de la hoja. Bernstein, en 1995, trabajando con sorgo salinizado a 100 mM, encontró que el sodio aumentaba en 40 a 60% con respecto al control, siendo mayor la concentración en las hojas más adultas.

Colmer, *et al.*, en 1995, trabajando con la variedad tolerante "Spring", encontraron una distribución similar de sodio a los 18 días de crecimiento a 200 mM de NaCl. Estos autores encontraron que la concentración de sodio en la hoja No. 1, la más vieja fue de 3,300 $\mu\text{M/g PS}$ y en la hoja No. 4, la más joven fue de 266 $\mu\text{M/g PS}$. Por otro lado, Munns, *et al.*, en 1995, reportan, para la variedad tolerante "kharchia" creciendo por 21 días a 150 mM de NaCl, una concentración de sodio en la tercera hoja de 270 $\mu\text{M/g PS}$. En nuestra

investigación encontramos 460 $\mu\text{M/g}$ PS en la misma hoja, a los 30 días de crecimiento en 150 mM de NaCl, desde la germinación.

Este resultado es importante si consideramos lo reportado por Yeo, *et al.*, en 1985. Estos investigadores encontraron en arroz salinizado un patrón de distribución del sodio en las hojas similar al de esta investigación. El dato interesante es que la tasa de asimilación neta para el CO_2 ($\mu\text{moles/m}^2\cdot\text{seg}$) disminuye de la misma forma, entre más sodio en la hoja, mayor es la disminución de la fijación de CO_2 . Yeo, *et al.*, en 1985, concluyen que la disminución de la fijación de CO_2 en las plantas salinizadas se da primeramente en las hojas más adultas donde se acumula el sodio en mayor cantidad.

La concentración de potasio en hojas de las plantas experimentales a 75 y 150 mM NaCl (Figura 10), aumenta conforme aumenta la concentración de sodio en la hoja; sin embargo cuando este ion rebasa la concentración de 500 $\mu\text{moles/g}$ P.S., el potasio se empieza a perder del tejido foliar (Figuras 9 y 10). Salama, *et al.*, en 1994, encuentra un patrón similar, el sodio aumenta en el vástago hasta que la concentración de sodio en el medio de crecimiento alcanza 100 mM, momento en el cual el potasio se empieza a perder del vástago. Gorham, en 1994, reporta para los trigos hexaploides,

que en salinidades externas menores a 100 mM de NaCl, la discriminación entre el K^+ y Na^+ resultan en concentraciones bajas de sodio en la hoja y un mantenimiento similar de potasio que el de las plantas control.

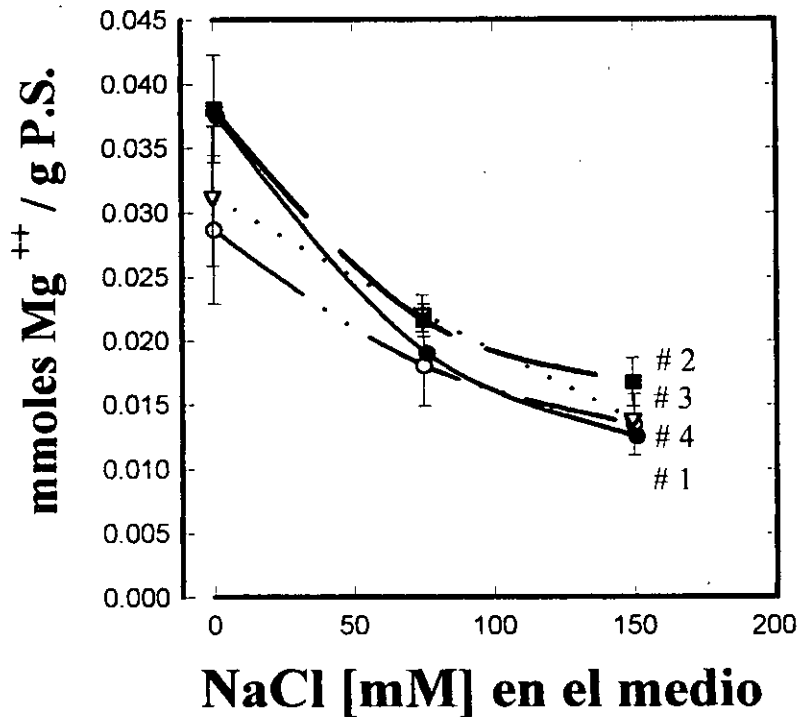


Figura 12

Efecto de la salinidad en el contenido Mg^{++} en las hojas de *Triticum aestivum* cv. Pavón. Los números dentro de la gráfica (#) indican la edad de la hoja, siendo el valor más alto para la hoja más joven.

Se ha reportado para *Triticum aestivum*, que el grado de tolerancia correlaciona inversamente con la concentración de sodio acumulada en las hojas (Schatainan, *et al.*, 1991). Por otro lado, Colmer, *et al.*, en 1995, comentan que la tolerancia en cereales está asociada a la acumulación de sodio en las hojas viejas y a un continuo transporte de potasio. Kent y Lauchli, en 1985, mencionan que la selectividad de las plantas entre potasio y sodio es un factor importante en la tolerancia a la salinidad.

El potasio en cereales juega un papel importante en el ajuste osmótico, juntamente con los solutos orgánicos de bajo peso molecular (Colmer, *et al.*, 1995). Estos autores reportan que en la variedad "chinese spring" al ser salinizada durante 18 días, solutos como asparagina y glicinbetaína aumentan considerablemente y la prolina y la glucosa libre se mantienen estables. Interesante es notar que el patrón de acumulación de estos solutos es similar al patrón de acumulación del sodio, mayor en la hojas viejas y menor en las jóvenes.

El mantenimiento adecuado de potasio es necesario para continuar con el crecimiento, ya que participa en el mantenimiento de la turgencia celular y es clave en el funcionamiento de algunas

enzimas (Greenway y Munns, 1980; Leigh y Wyn Jones, 1984). Una concentración de potasio entre 100 a 150 mM es requerida en el citoplasma para la síntesis de proteínas. Además, el sodio no puede ocupar la función celular del potasio, independientemente de la resistencia del cultivar (Zsoldos, *et al.*, 1990). Por otro lado, Brugnoli y Bjorkman, en 1992, encuentran que el algodón salinizado acumula una gran cantidad de sodio en las hojas, pero al mismo tiempo mantiene una gran cantidad de potasio en las mismas. Estos autores concluyen que esta característica es crucial para mantener la integridad de los sistemas fotosintéticos bajo un estrés salino y por lo tanto un importante prerequisite para la tolerancia salina.

En resumen, los resultados en la relación sodio/potasio de las hojas de *Triticum aestivum* cv. Pavón salinizado a 75 mM y 150mM fueron los siguientes:

1. La concentración de sodio disminuye de la hoja más vieja a la más joven en ambos tratamientos.
2. La concentración de potasio aumenta de la hoja más vieja a la más joven en ambos tratamientos.
3. El potasio en una misma hoja disminuye solo si la concentración de sodio rebasa los 500 μ moles/g Peso Seco

4. La relación K^+/Na^+ aumenta de la hoja más vieja a la hoja más joven, siendo los resultados para el tratamiento a 75 mM de 0.871 a 5.50 y del tratamiento a 150 mM de 0.275 a 3.727

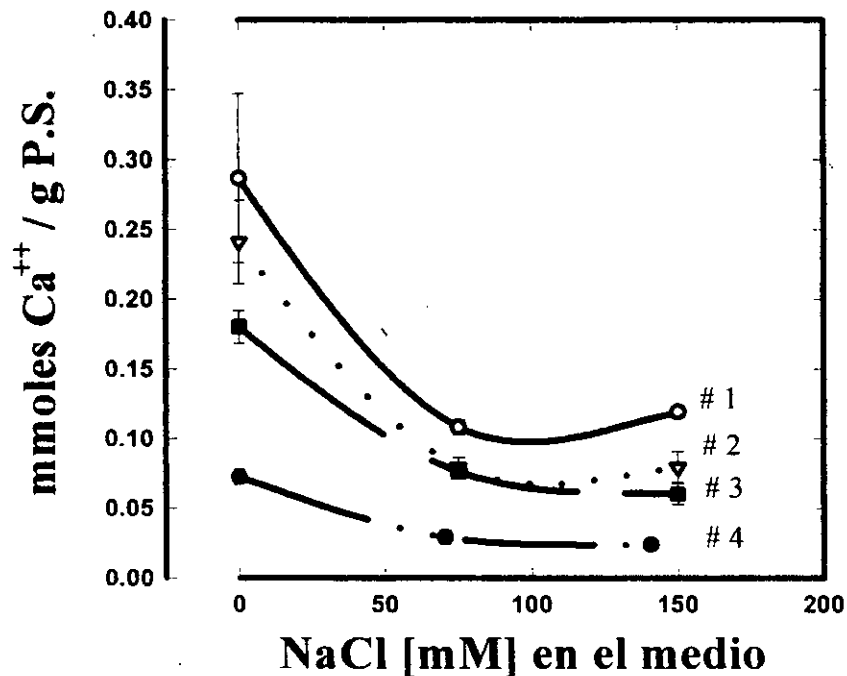


Figura 11

Efecto de la salinidad en el contenido de Ca^{++} en las hojas de *Triticum aestivum* cv. Pavón. Los números dentro de la gráfica (#) indican la edad de la hoja, siendo el valor más alto para la hoja más joven.

El mismo patrón de distribución fue encontrado por Wolf, *et al.*, en 1991, trabajando con sorgo salinizado a 100 mM. Estos autores en unas de sus conclusiones afirman que el tallo es de vital importancia en la acumulación de sodio en el tejido foliar.

El calcio, como lo hemos mencionado, es de vital importancia en el funcionamiento de la membrana plasmática (Gorham y Bridges, 1995) y el correcto ensamblaje de la pared (Kafkafi y Bernstein, 1996).

Por otro lado, uno de los síntomas de toxicidad sódica es la disminución de calcio en el vástago (Davenport *et al.*, 1997). En esta investigación se encontró que el calcio disminuye conforme la concentración de sodio aumenta en las hojas. Según los resultados (Figura 9 y 11) la acumulación de 100 μmoles de Na^+ /g P.S. es suficiente como para desplazar la mitad del calcio en la hoja más joven de la planta. Sin embargo, a excepción de los casos donde la concentración de sodio alcanza 500 μmoles de Na^+ /g P.S., el potasio siempre se acumula en las hojas, indicando la integridad y buen funcionamiento de la membrana (Velasco, 1994).

Por lo anterior, creemos que a excepción de los casos donde la concentración de sodio provoca pérdida de potasio, la membrana se encuentra íntegra y funcional, y por lo tanto el calcio que se pierde del tejido foliar (Figura 11) proviene de la pared celular en un proceso de intercambio iónico. Esto mismo se puede notar en la figura 9 y 11, en donde es evidente en una misma hoja la acumulación de Na^+ y la pérdida de Ca^{++} . Como se puede observar, no hay una pérdida mayor

de calcio (por ejemplo en la hoja 1), aún cuando aumente la cantidad de sodio en la hoja o en la solución nutritiva, lo cual corrobora el hecho de que se trata de un intercambio iónico a nivel de la pared celular en donde el calcio se encuentra mayoritariamente asociado a pectinas ácidas (Marschner, 1986).

Por otro lado, Davenport *et al.*, en 1997, mencionan que es difícil distinguir si el proceso que lleva a la pérdida de calcio medido en peso seco es producto de una pérdida apoplástica de calcio en pared o una disminución de la toma de calcio, producto de la salinización. Sin embargo, apuntan que debido a que el calcio es requerido en la pared celular, así como en funciones citoplasmáticas, el mantenimiento de un adecuado nivel de calcio es necesario para el crecimiento de la planta.

Como ya se mencionó, el magnesio no sigue un patrón muy definido en las plantas control. La tendencia no significativa es que exista más en las zonas más adultas. Sin embargo, cuando la plantas son sometidas a estrés, se pierde hasta el 70 % de magnesio con respecto al control (Figura 12). La pérdida de magnesio no tiene una relación directa con la acumulación de Na^+ en la hoja, aparentemente son independientes.

El magnesio se distribuye tanto en pared, asociado a pectinas, como en citoplasma, pero principalmente se encuentra asociado a la

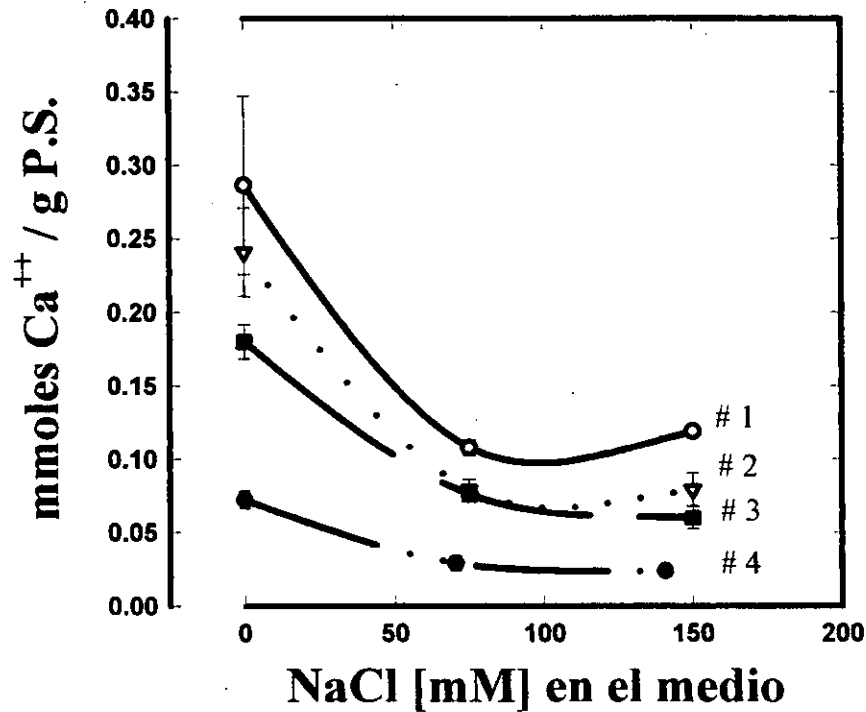


Figura 11

Efecto de la salinidad en el contenido de Ca^{++} en las hojas de *Triticum aestivum* cv. Pavón. Los números dentro de la gráfica (#) indican la edad de la hoja, siendo el valor más alto para la hoja más joven.

molécula de clorofila en los cloroplastos. Por lo anterior, al no encontrarse pérdida de clorofila, sino por lo contrario, las plantas salinizadas presentan una mayor concentración de clorofila por unidad

de área (Figura 13), creemos que la mayor parte del magnesio perdido proviene de la pared, donde es intercambiado por el sodio

Bernstein, *et al*, en 1995, trabajando con sorgo encontraron que la salinización provoca un pérdida de magnesio en las hojas, disminuyendo de la base a la punta de la planta; esto es, de las hojas más adultas a las más jóvenes. En esta investigación, el magnesio se pierde por la salinización, sin importar la edad de la hoja o la posición en la planta, solo al aumentar la cantidad de NaCl en el medio nutritivo.

III. Efectos en los procesos primarios de la Fotosíntesis

El crecimiento de las plantas está directamente influenciado por la cantidad y calidad de luz que éstas reciben durante su desarrollo. La luz es necesaria no solo como la fuente energética de la fotosíntesis, sino también como activador y modulador de las respuestas morfológicas (Anderson, 1986).

El proceso fotosintético en las plantas permite capturar la energía solar incidente en energía química en forma de ATP y NADPH y utilizar éstas para la transformación del CO₂ en carbohidratos y biomasa. Sin energía electromagnética no hay fotosíntesis. De esta manera, no es de sorprenderse que las plantas han desarrollado una serie de respuestas hacia los cambios en la luz, el factor medioambiental más importante en este proceso (Baker y Ort, 1991).

El crecimiento de una planta y la producción final de un cultivo dependen primeramente de dos factores (Gieger, 1991):

1. Qué tan eficientemente la luz incidente es usada para la asimilación de bióxido de carbono.
2. Qué tan eficientemente este carbono asimilado es distribuido entre todas las partes de la planta

Estos procesos no requerirían ninguna regulación si las condiciones ambientales fueran ideales; es decir, donde todos los parámetros medioambientales estuvieran estables. Sin embargo, en el medio que rodea a la planta, las condiciones son modificadas constantemente a lo largo del día y durante las estaciones del año. Por ejemplo, una planta podría estar bajo la sombra de una nube y repentinamente ser iluminada por un claro de sol con intensidades lumínicas saturantes, ¿cómo controla la planta estas variaciones, de tal manera que se mantenga un eficiente uso de la energía lumínica para la asimilación de bióxido de carbono? Tal vez, el factor más importante que le permite a una planta mantener el uso eficiente de la energía lumínica en un medio ambiente contrastante es la habilidad de preservar un balance entre los distintos procesos que convierten la energía lumínica en biomasa, siendo estos:

- a. Absorción de la energía *vs.* Generación de NADPH y ATP
- b. Generación de NADPH y ATP *vs.* Asimilación de CO₂
- c. Asimilación de CO₂ *vs.* Síntesis de Sacarosa y almidón
- d. Síntesis de Sacarosa y almidón *vs.* Uso de los fotosintetatos

Cuando estos procesos entran en un desbalance, automáticamente se encienden mecanismos de control interno. Este

control puede darse a nivel enzimático, por regulación de las vías metabólicas involucradas o por regulación de los mecanismos de absorción de energía, tanto a nivel de pigmentos como a nivel de centros de reacción y acarreadores electrónicos (Gieger, 1991; Horton y Ruban, 1992).

En condiciones de estrés abiótico, estos desbalances se acentúan. La cantidad de energía lumínica que llega a los fotosistemas pudiera no ser saturante, pero debido a que el uso de esta energía se encuentra disminuída, los procesos de absorción de luz son los primeramente afectados (Bjorkman, 1987, Falk, *et al.*, 1994). Por tanto, mecanismos de control de la excitación y la absorción de luz son encendidos para liberar el exceso de energía, manteniendo el balance entre la captura de la energía fotónica y la conversión de ésta en energía química, reducción del CO₂ en azúcares y el uso de éstos en el crecimiento (Horton y Ruban, 1992). Cuando la luz absorbida sobrepasa los requerimientos de la fotosíntesis, la energía capturada es disipada predominantemente como calor y fluorescencia de la clorofila *a*, evadiendo de esta manera un proceso de fotoinhibición (Sharman y Hall, 1991; Falk, *et al.*, 1994).

Como ya se ha mencionado, la salinidad en los suelos es uno de los principales problemas abióticos que afectan el crecimiento de las plantas. El crecimiento de las plantas depende del proceso fotosintético, el cual se ve afectado en proporción a la concentración y tipo de sal que se encuentre en el suelo (Singh y Dubey, 1995).

La salinidad afecta la fotosíntesis de manera distinta en cada planta. Por ejemplo: la apertura estomática, la presión intracelular de CO₂, la concentración de pigmentos, la estructura del cloroplasto, el acarreo electrónico y la fijación de CO₂ (Wingnarajah y Baker, 1981; Seemann y Critchley, 1985; Seemann y Sharkey, 1986; Carter y Cheesman, 1993).

En estas condiciones, la energía absorbida por las plantas salinizadas pudiera estar en exceso para su uso en el proceso fotosintético. En 1989, Neal y Melis, trabajando con *Chlamydomonas reinhardtii*, reportaron que la salinidad promueve la fotoinhibición de la fotosíntesis.

Los resultados encontrados en esta investigación fueron los siguientes:

A. Efectos en la concentración de Clorofila

En la figura 13 se puede observar que la concentración de clorofila total por unidad de peso seco aumenta significativamente conforme se incrementa la concentración de NaCl en el medio de cultivo. Brugnoli y Bjorkman, en 1992, trabajando con algodón encuentran un incremento de hasta el 40% de la clorofila total.

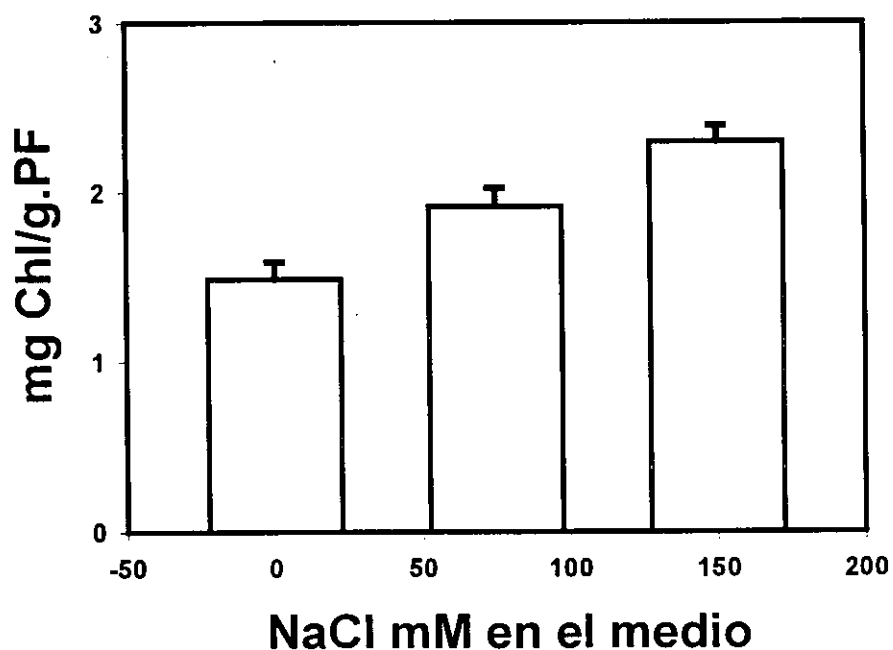


Figura 13

Efecto de la salinidad en el contenido de clorofila total de *Triticum aestivum* cv. Pavón a los 28 días después de la siembra según el tratamiento. n=5

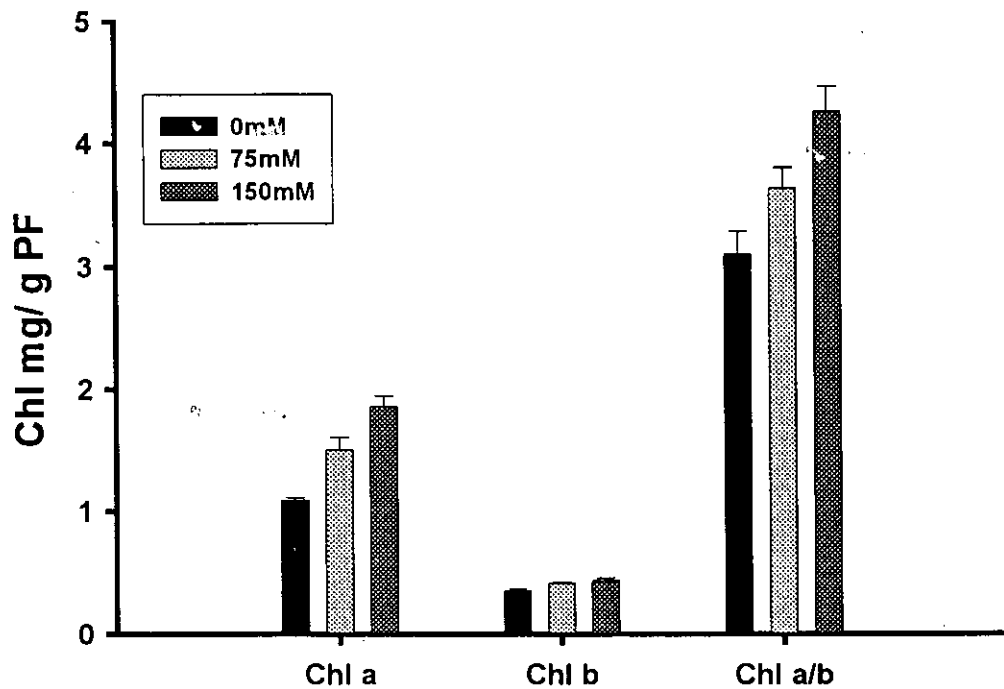


Figura 14

Efecto de la salinidad en el contenido de clorofila "a", "b" y la relación clorofila a/b en *Triticum aestivum* cv. Pavón a los 28 días después de la siembra en cada uno de los tratamientos. n=5

El incremento de clorofila total encontrado en esta investigación con trigo está dado por un aumento en la concentración de Clorofila "a" con respecto a la Clorofila "b" (Figura 14). Esta diferencia también se observa en un cambio de la relación Clorofila a/b, habiendo un aumento hasta de un 38% en el tratamiento a 150 mM de NaCl con respecto al control.

Li y Ong, en 1998, trabajando con *Acrostichum aureum* encontraron un incremento de la relación de clorofila *a/b* de un 23% cuando las plantas eran expuestas a 170 mM de NaCl; la clorofila total también aumenta en un 27%. Krishnaraj, *et al.*, en 1992 trabajando con dos variedades de trigo con diferente sensibilidad al Na⁺, encontraron en ambas un aumento del 40% en la clorofila total, siendo la concentración de clorofila "a" la que se modifica primordialmente. La relación de Clorofila *a/b* aumenta significativamente en un 10%. Sultana, *et al.*, en 1999, trabajando con arroz encontraron que aun cuando la concentración total de clorofila por gramo de tejido fresco disminuye significativamente conforme aumenta la cantidad de sal en el medio, la relación de clorofila *a/b* aumenta significativamente, sin embargo no discuten lo encontrado en su investigaciones. Un dato interesante es lo encontrado por Panneerselvam, *et al.*, en 1997, en rábano; cuando las plantas son salinizadas hasta 80 mM por sesenta días la concentración de clorofila disminuye casi en un 50% y la capacidad fotosintética neta ($\mu\text{moles CO}_2/\text{m}^2.\text{seg}$) en un 39%. Sin embargo cuando a estas plantas se les aplica un fungicida (Triadimefón), el cual tiene efectos de regulador del crecimiento, la clorofila, en presencia del estrés salino aumenta en un 90% y la

capacidad fotosintética en 64%, siendo evidente la participación del pigmento en la recuperación de la eficiencia de fijación de CO₂ y por ende en el crecimiento de la planta bajo estrés salino.

Anderson, en 1986, reporta que los cambios en la relación entre la clorofila *a/b*, están relacionados a un cambio en la relación de membranas tilacoidales apiladas y las no apiladas dentro del cloroplasto, todo esto bajo condiciones contrastantes de intensidad lumínica (sombra y sol). Los cambios de apilamiento están directamente ligados a un cambio en la cantidad de cada fotosistema. Se reconoce que el fotosistema II (PSII) se encuentra distribuido en las zonas apiladas y el fotosistema I (PSI), el citocromo *b/f* y la ATPasa se encuentran distribuidos en la zona no apilada (Anderson, 1986).

Chow, *et al*, en 1990, sugieren que estos cambios estequiométricos entre los fotosistemas se relacionan con ajustes adaptativos para incrementar la eficiencia cuántica fotosintética. Es bien conocido que las plantas creciendo en sombra y las plantas creciendo en luz directa del sol tienen velocidades distintas de acarreo electrónico y fijación de CO₂, sin embargo la eficiencia cuántica en ambos casos es la misma (Anderson, 1986). Carter y Cheesman, en 1993, encontraron en plantas de lechuga salinizadas un incremento en la relación clorofila

a/b, así como una disminución en el grado de apilamiento de los cloroplastos obtenidos de plantas salinizadas. Los autores relacionan este cambio a un proceso de regulación de la energía de excitación y no a un efecto de la salinización, ya que estos cambios son reversibles cuando la salinidad es eliminada. Hibino, *et al.*, en 1996, trabajando con cianobacteria halotolerante (*Aphanothece halophytica*) encontraron que la hipersalinidad aumenta la concentración de clorofila "a" y PSI, mientras que la concentración de PSII y citocromo b/f permanecen constantes. Keiper, *et al.*, en 1998, trabajando con *Eucalyptus* encontraron que en plantas provenientes de cultivos celulares adaptadas a la salinidad, la estructura del cloroplasto se pierde, disminuyendo el grado de apilamiento, aumentando el espacio del lumen e incrementándose los gránulos de almidón; sin embargo, la eficiencia fotoquímica para PSII no se modifica, aún cuando la liberación de oxígeno disminuye al aumentar la salinidad en el medio de ensayo. Por otro lado, en esta misma investigación se encuentra también que el número de cloroplastos por células aumenta en un 100%, sin embargo la cantidad de clorofila por unidad de área disminuye. Estos autores concluyen que los cambios en la estructura y la cantidad de pigmentos del cloroplasto pudiera ser una respuesta

adaptativa para prevenir un daño de la fotosíntesis al reducir la posibilidad de fotoinhibición del fotosistema II. Datos similares fueron encontrados por Hernández, *et al.*, en 1995, quienes trabajando con chícharos salinizados, encontraron que la clorofila disminuye y la eficiencia de PSII no se modifica, pero la estructura del cloroplasto se modifica existiendo menor grado de apilamiento y acumulación de granos de almidón. Salma, *et al.*, en 1994, trabajando con las variedades "Kharchia" (tolerante) y "T-79" (sensible) de *Triticum aestivum* encontraron que la salinidad disminuye la concentración de clorofila; sin embargo provoca un aumento de la relación clorofila *a/b* y modifica la estructura del cloroplasto encontrándose menos apilamiento de los tilacoides, gránulos de almidón y mayor espacio del lumen en los cloroplastos de las plantas salinizadas. En este experimento el aumento de la relación de clorofila *a/b* se da con mayor magnitud en las plantas sensibles. Estos autores relacionan este dato con una disminución de los complejos antena de PSII, debido que la mayor parte de la clorofila *b* se encuentra en estos complejos, lo cual es similar a los cambios dados en las plantas creciendo a intensidades de luz variables.

Anderson, en 1986, menciona en sus estudios con plantas sometidas a sol o sombra, que el incremento de la relación clorofila a/b es inversamente proporcional al grado de apilamiento del cloroplasto, y este grado de apilamiento es a su vez inversamente proporcional a la relación fotosistema I/II (PSI/PSII). Los datos indican que plantas creciendo a la luz directa del sol tienen una relación de clorofila a/b de 3, un bajo grado de apilamiento de las membranas tilacoidales y una relación mayor entre PSI/PSII, con respecto a las plantas de sombra. Por lo tanto, las hojas de las plantas de sombra absorben más luz que las de sol. Baker y Ort, en 1991, mencionan que el fotosistema I funciona como un drenador de energía del fotosistema II. Esto significa que entre más PSI con respecto a PSII, mucho más eficientemente se drena la energía que se acumula en PSII, ya que éstos, mencionan los autores, no depende del flujo cíclico o acíclico, los cuales se ha comprobado que *in vivo* funcionan a la misma velocidad bajo cualquier condición lumínica (Melis , 1991).

Por otro lado, se han descubierto también diferencias en el tamaño de antena de PSII en las plantas creciendo en sombra y en sol directo, siendo mayores las de sombra y menores las de sol. En las primeras

con el propósito de captar la mayor cantidad de fotones y en las segundas la menor cantidad de ellos (Anderson ,1986).

En condiciones de estrés, la energía que llega a los centros de reacción no puede ser utilizada tan eficientemente debido a que los procesos de conversión de ésta en energía química y el uso de NADPH y ATP se encuentran restringidos, por lo cual dicha energía de excitación debe ser liberada por algún mecanismo no fotoquímico. Como se mencionó, los cambios de concentración de clorofila están relacionados con cambios en el tamaño de los complejos antena. El cambio de proporciones de clorofila a y b en las plantas salinizadas pudiera también estar asociado (no se tienen datos) con un cambio del tamaño del complejo antena. Una antena menor en las plantas bajo estrés ayudaría a disminuir la absorbancia del cloroplasto y así disminuir la cantidad de energía llegando a los centros de reacción de PSII. Seeman y Critchley, en 1985, trabajando con frijol común, encontraron que la salinidad disminuye la absorbancia de los cloroplastos en un 7 %, comparado con el control.

En conclusión, creemos que los cambios estructurales del cloroplasto en las plantas salinizadas, les permiten controlar el flujo de excitación, llegando específicamente a PSII, ya que al haber una

disminución del grado de apilamiento en las membranas del cloroplasto, así como del tamaño del compleja antena, tiene como resultado una reducción de la absorbancia del mismo y un aumento de la transmitancia. En relación directa con el aumento de la relación de clorofila *a/b* está el hecho de un aumento de PSI en las plantas salinizadas. Esta condición también tiene un efecto directo en la regulación del flujo electrónico y la presión de excitación en PSII, ya que al haber más PSI la oxidación de PSII es más rápida.

B. Efectos sobre la eficiencia Fotoquímica de PSII (F_v/F_m)

La eficiencia de captura de fotones por los fotosistemas puede ser calculado a través del producto de la eficiencia fotoquímica. Como ya lo hemos mencionado, el producto de la eficiencia fotoquímica (F_v/F_m) es la probabilidad de captura fotónica por el centro de PSII, cuando éste se encuentra abierto (oxidado). La eficiencia fotoquímica (F_v/F_m) es la relación que existe entre la fluorescencia variable ($F_v = F_m - F_o$) y la fluorescencia máxima (F_m) de PSII que se emite cuando la plastoquinona está completamente reducida y no se puede llevar a cabo otra separación de carga, y la fluorescencia mínima (F_o), es la

emisión de fluorescencia por los complejos antena y el centro de reacción de PSII antes que se libere el electrón.

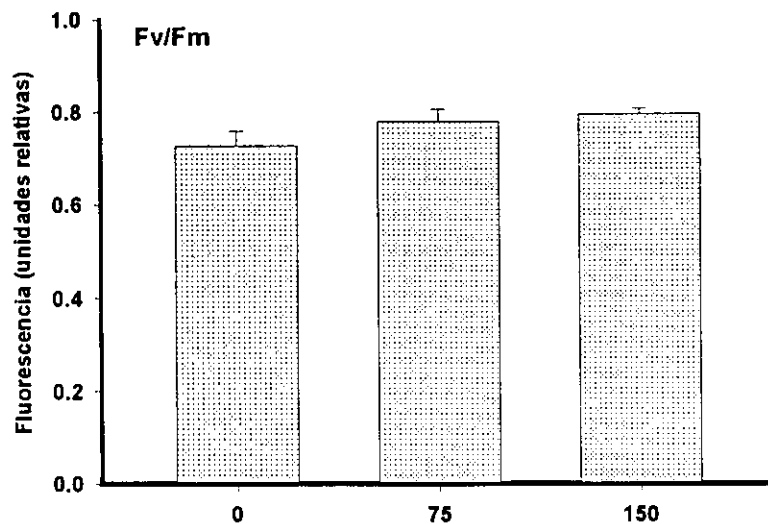


Figura 15

Efecto de la salinidad sobre el rendimiento fotoquímico para PSII en *Triticum aestivum* cv. Pavón 28 después de las siembra en cada uno de los tratamientos. n=14.

Las modificaciones en el producto de la eficiencia fotoquímica de PSII son indicio de cambios en el estado de los centros de reacción de PSII, por efectos en: (1) La estructura del fotosistema (2) El acoplamiento de sus partes (3) La constante de decaimiento no fotoquímico y/o (4) La velocidad de acarreo electrónico (Shabala, et al., 1998).

La Figura 15 muestra que el producto de la eficiencia fotoquímica para PSII no se modifica sustancialmente, de hecho se incrementa significativamente con el aumento de NaCl en el medio de cultivo, de 0.727 en las plantas control, 0.782 y 0.793 en las plantas creciendo a 75 y 150 mM de NaCl, respectivamente.

Li y Ong, en 1998, trabajando con *Acrostichum aureum* reportan un incremento en los valores de F_v/F_m , el cual es lineal al incremento de la liberación de oxígeno y el incremento de la relación clorofila a/b . En base a estos resultados Lin y Ong (1998) concluyen que el incremento de la relación clorofila a/b es indicativo de una disminución de tamaño de la antena de PSII, lo cual corresponde con la disminución del valor de la fluorescencia mínima (F_o). De esta manera, la respuesta de estas plantas es similar a lo encontrado en plantas expuestas a un estrés lumínico elevado, sugiriendo que el incremento del estado de reducción de Qa pudiera actuar como señal para la aclimatación del aparato fotosintético.

Por otro lado, los resultados en frijol (planta sensible) y algodón (planta tolerante); sugieren que la eficiencia fotoquímica para PSII no se modifica, pero si disminuye la velocidad de liberación de oxígeno (Brugnoli y Lauteri, 1991), como lo encontrado en esta investigación.

Brugnoli y Bjorkman, en 1992, trabajando con algodón, demuestran que aún cuando hay una disminución en la capacidad fotosintética, medida como fijación de CO_2 , no hay cambios en la capacidad de la absorción de luz como tampoco las hay en la eficiencia de conversión de energía luminosa en energía química.

La Figura 16 muestra que las fluorescencias máxima, mínima y variable también disminuyen proporcionalmente conforme aumenta la salinidad en el medio de cultivo. Sanjay, et al, en 1991, trabajando con la variedad HD-2329 de *Triticum aestivum* salinizado a 100, 300 y 600 mM de NaCl durante siete días, reportan resultados similares a los encontrados en esta investigación. Estos autores concluyen que la salinidad no afecta la eficiencia fotoquímica de PSII, sin embargo se debe hacer notar que el estrés se aplicó en un momento específico del crecimiento de la planta y por un período de siete días.

Horton y Boyer, en 1991, mencionan que un patrón de fluorescencia como el encontrado en esta investigación es indicio de un aumento en la constante de decaimiento térmico a nivel de complejo antena pero sin efectos en la eficiencia fotoquímica para PSII. Dicho de otra manera, el valor de F_0 se sabe es producto de la transferencia de excitones en el complejo antena hacia el centro de

reacción de PSII. Este valor es independiente del estado redox de Qa, pero varía con la densidad de excitones llegando al complejo antena.

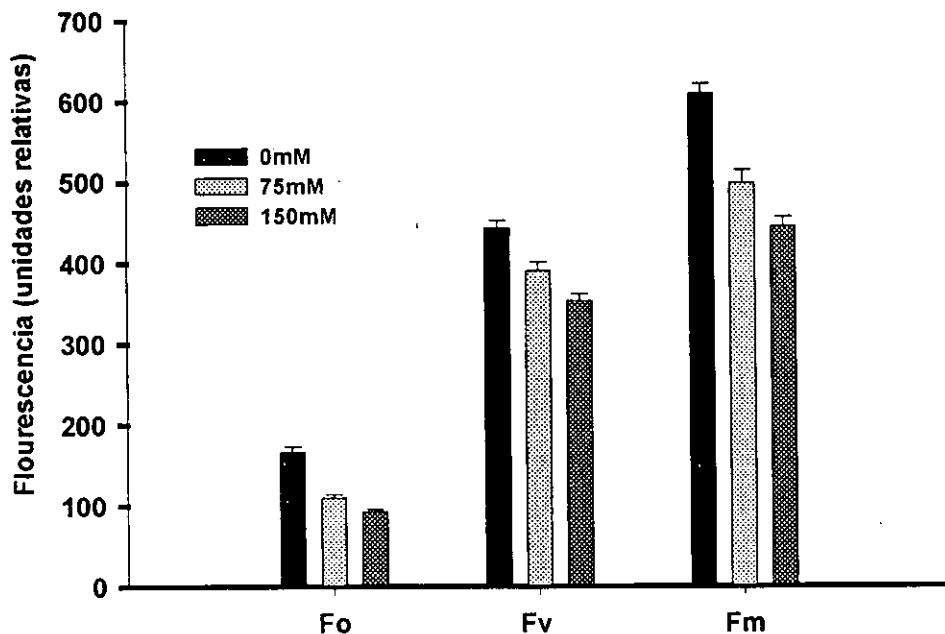


Figura 16

Efecto de la salinidad en los parámetros de fluorescencia F_m , F_v , F_o en *Triticum aestivum* cv. Pavón a los 28 días de la siembra según el tratamiento. n=14

Como se observa en la Figura 16, F_o disminuye, esto podría estar dado por un aumento en la eficiencia de absorción del centro de reacción de PSII; sin embargo, F_m también disminuye en la misma proporción, por lo que la disminución de la fluorescencia variable se

explica por un decaimiento térmico de la excitación a nivel del complejo antena, lo cual mantiene o incrementa la eficiencia de fotoquímica de PSII.

Por otro lado, la disminución proporcional de Fm y Fo está relacionado con cambios de estado. Al existir una sobreredución de QA, la antena periférica del PSII es fosforilada y sale de la zona de apilamiento y migra hacia la zona no apilada del tilacoide, liberando su energía sobre el PSI (Anderson, 1986). Preston, et al, en 1987 menciona que entre mayor apilamiento exista en un cloroplasto, menor será la pérdida de energía por el proceso de "spill over" ya que las distancias entre los fotosistemas son mayores. Sin embargo, en cloroplastos que presentan poco apilamiento de sus tilacoides, gran parte de la energía de excitación es disipada por procesos de cambios de estado y "spill over". Estos mismo autores encontraron que los cationes son necesarios para el proceso de apilamiento, siendo los cationes divalentes más efectivos.

C. Efecto sobre las variables de Trabajo fotoquímico (qP) y Trabajo no Fotoquímico (qNP)

Como ya lo hemos mencionado, según el planteamiento de Butler, *et al*, en 1977, la energía de excitación que llega a los centros de reacción a través de los complejos antena es usada en parte para realizar trabajo fotoquímico (Kp), parte se pierde como calor (Kd) y parte puede ser transferida a otros sistemas por cambios de estado (Kt) y/o por eventos de "spill over" o transferencia de energía a pigmentos no fluorescentes a temperatura ambiente (Kf).

La Figura 17 muestra la liberación de energía producto del trabajo fotoquímico (qP). Se puede observar que conforme aumenta el flujo fotónico, aumenta la energía de excitación y la presión de reducción sobre QA (1-qP), dando como resultado una disminución en el uso de la energía de excitación para trabajo fotoquímico en PSII .

De manera inversa, la figura 18 muestra la liberación de energía a través de trabajo no fotoquímico (qNP). Al aumentar el flujo fotónico y la presión de reducción de QA, la energía liberada a través de eventos térmicos aumenta. Es interesante notar que en los tratamientos a 75mM y 150mM liberación térmica aumenta más rápidamente que el control, indicando que la presión de reducción sobre QA aumenta con mayor

velocidad conforme aumenta la densidad de flujo fotónico. Salma, et al., en 1994, trabajando con un cultivar tolerante de trigo, *Kharchia*, encontraron que la salinidad incrementa los valores de qNP de 0.65 (control) a 0.775 (100mM de NaCl) utilizando una sola intensidad de luz, 1100 $\mu\text{moles}/\text{m}^2.\text{seg}$. Esto demuestra que la salinidad provoca la liberación de la energía de excitación por mecanismos no-fotoquímicos.

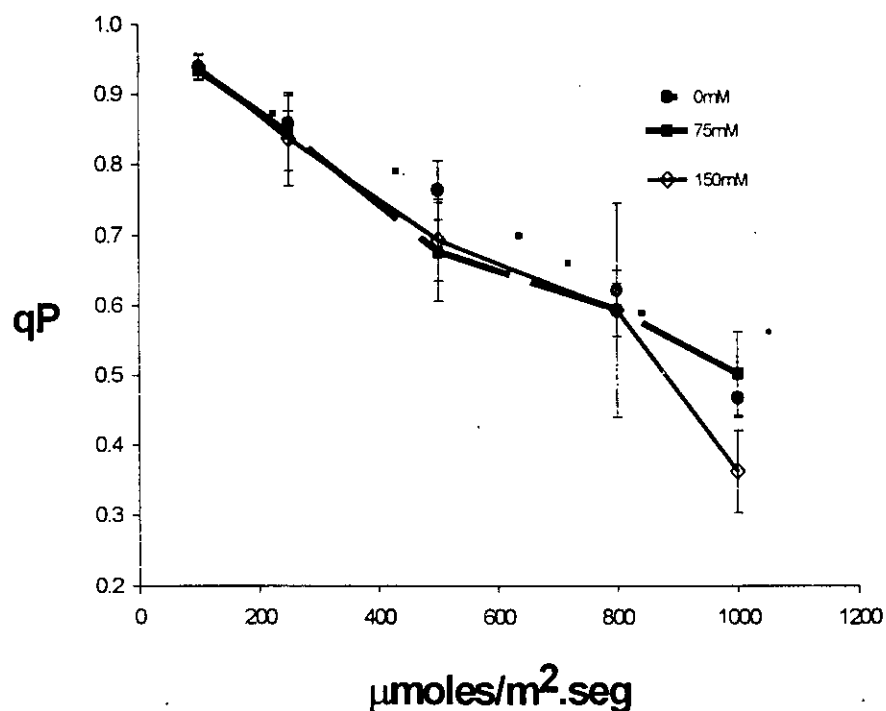


Figura 17

Efecto de la salinidad en el producto fotoquímico (qP) de *Triticum aestivum* cv. Pavón a los 28 días después de la siembra en cada un de los tratamientos. n=3

velocidad conforme aumenta la densidad de flujo fotónico. Salma, *et al.*, en 1994, trabajando con un cultivar tolerante de trigo, Kharchia, encontraron que la salinidad incrementa los valores de qNP de 0.65 (control) a 0.775 (100mM de NaCl) utilizando una sola intensidad de luz, 1100 $\mu\text{moles}/\text{m}^2.\text{seg}$. Esto demuestra que la salinidad provoca la liberación de la energía de excitación por mecanismos no-fotoquímicos.

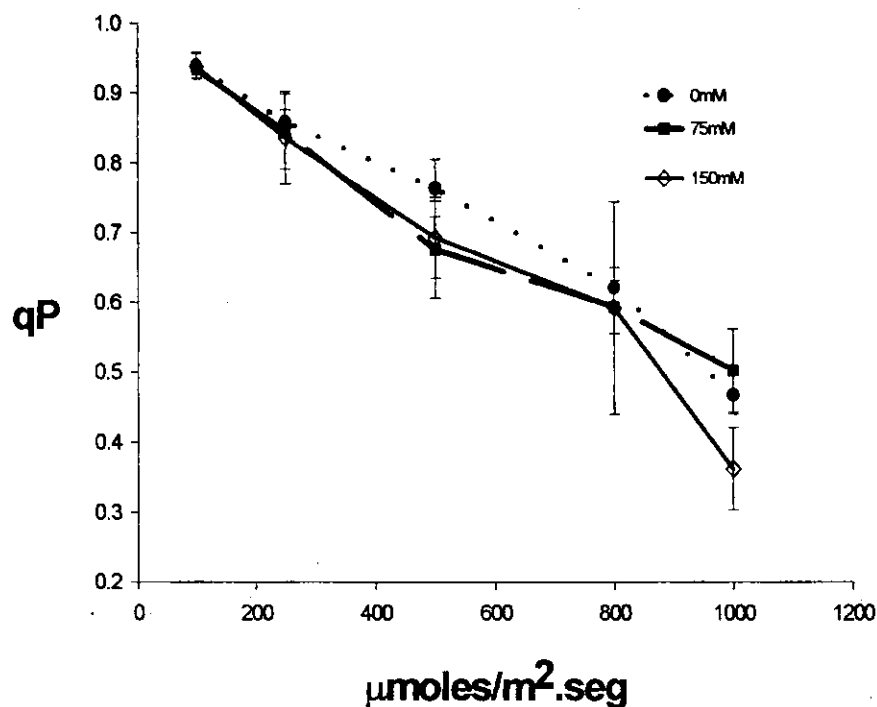


Figura 17

Efecto de la salinidad en el producto fotoquímico (qP) de *Triticum aestivum* cv. Pavón a los 28 días después de la siembra en cada un de los tratamientos. n=3

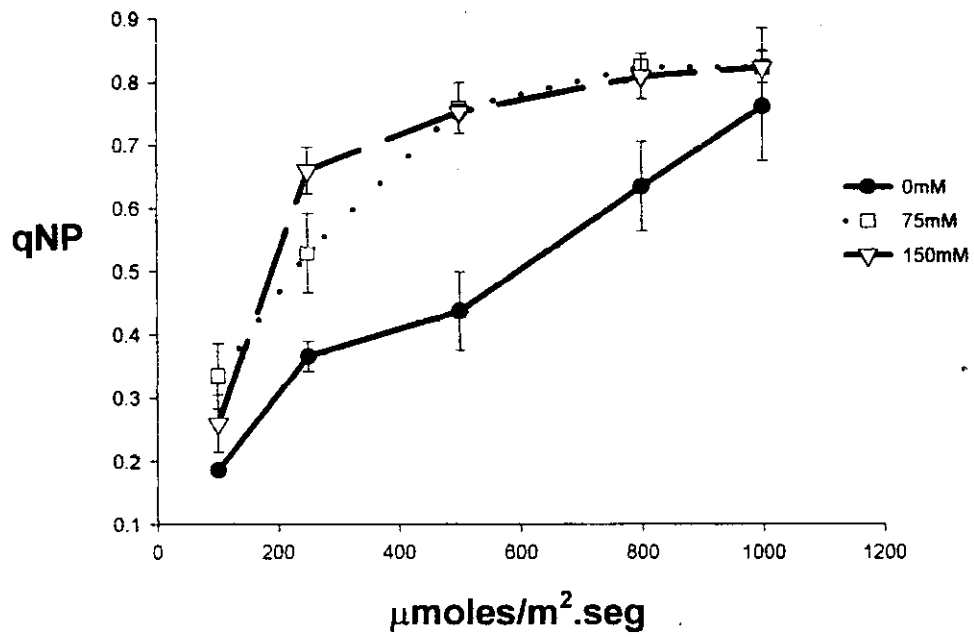


Figura 18
 Efecto de la salinidad en el producto No-fotoquímico (qNP) de *Triticum aestivum* cv. Pavón a los 28 días después de la siembra en cada un de los tratamientos. n=3

D. Efecto sobre el acarreo de electrones en PSII

El acarreo de electrones en PSII fue medido *in vivo* e *in situ*. Básicamente los acarreadores electrónicos de PSII son el centro de reacción de PSII (RCII), el primer aceptor, una feofitina; (Pheo), el segundo aceptor, quinona "a" (QA) y el tercer aceptor, la quinona "b" (QB). Esta última al estar doblemente reducida se hidrata y sale del complejo, convertida en plastoquinona (PQ) (Figura 1y 2).

Las mediciones *in vivo* se realizaron siguiendo la cinética de fluorescencia de PSII durante un segundo a temperatura ambiente, lo cual es conocido como cinética de Kautsky. Cada inflexión de la curva nos permite determinar el movimiento de los electrones a través de los acarreadores, hasta que PQ ésta completamente reducido (Strasser, *et al*, 1995; Bolhar-Nordenkampf y Oquist, 1998).

Como se puede observar en la Figura 19, existe una diferencia en las cinéticas de las plantas control y las que están bajo un estrés a 150 mM de NaCl. la cinética de las plantas a 75 mM tiene valores intermedios entre ambos extremos, control y 150 mM. La primera inflexión de la curva, en los primeros 100 μ seg es el valor de la fluorescencia mínima (F_0) y la salida inmediata de los electrones de los centros de reacción. La segunda inflexión a los 1000 μ seg es la

reducción de QA ; mientras que la tercera inflexión, a los 100 milisegundos es la reducción completa de Plastoquinona, tiempo en el

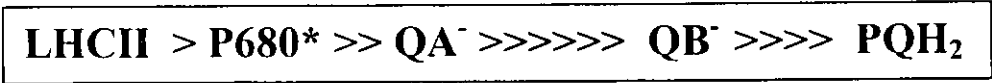
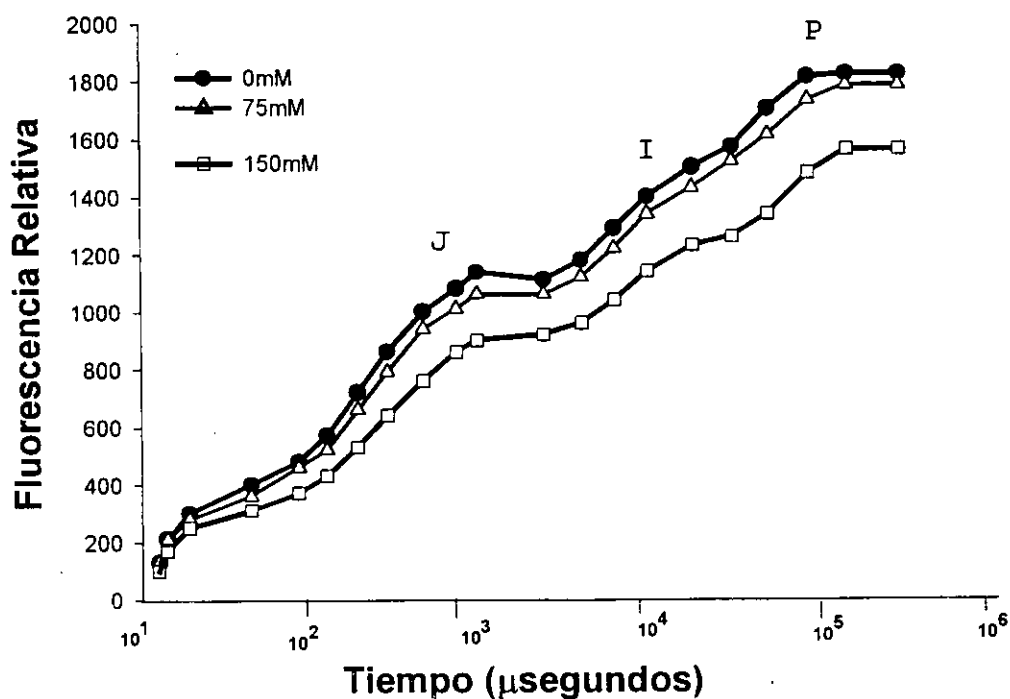


Figura 19
Efecto de la salinidad en el transporte electrónico de PSII *in vivo* medido por la cinética de fluorescencia de Kautsky en *Triticum aestivum* cv. Pavón a los 28 días de siembra en cada uno de los tratamientos. n=15

cual se alcanza la fluorescencia máxima (F_m), cuando el pulso es saturante. Se puede notar que en las plantas bajo estrés salino a 150mM presentan no sólo diferencias en los valores de F_o , F_m y F_v , comparados con los del control (Figura 16), sino también hay diferencias entre las pendientes de F_o a J (reducción de QA) y de J a P (oxidación de QA a reducción de QB y PQH_2); lo cual, en unidades relativas indica una diferencia en las velocidades de transporte entre cada uno de estos acarreadores. Por lo tanto, medido *in vivo*, la salinidad afecta la velocidad de transporte electrónico, sin embargo no disminuye la eficiencia con la que los fotones son capturados por los complejos antena y canalizados a los centros de reacción de PSII.

Es probable que la disminución en el acarreo electrónico en PSII se deba a una disminución del aporte de electrones en el lado donador, por inhibición del complejo liberador de oxígeno en PSII o a una reducción de la salida de electrones en el lado aceptor, en la plastoquinona. Bonghi y Loreto, en 1989, trabajando con plantas de olivo salinizado encontraron datos similares. Los datos presentados en este artículo muestran la cinética de fluorescencia durante los primeros 60 segundos. Si se analiza la Figura 16, se puede notar una disminución en los valores de F_o , F_m y F_v , sin embargo no hay

diferencia en los valores de la eficiencia fotoquímica (F_v/F_m) para PSII. De la misma manera que en esta investigación, Bongi y Loreto, en 1989, encuentran en las plantas de olivo salinizadas una disminución tanto en la reducción de QA como de QB, sin modificar los valores de la eficiencia fotoquímica de PSII. Krishnaraj, *et al.*, en 1992, trabajando con dos variedades de trigo con diferencias en su tolerancia al Na_2SO_4 , encuentran valores similares en las pendientes de Fo a J y de J a P.

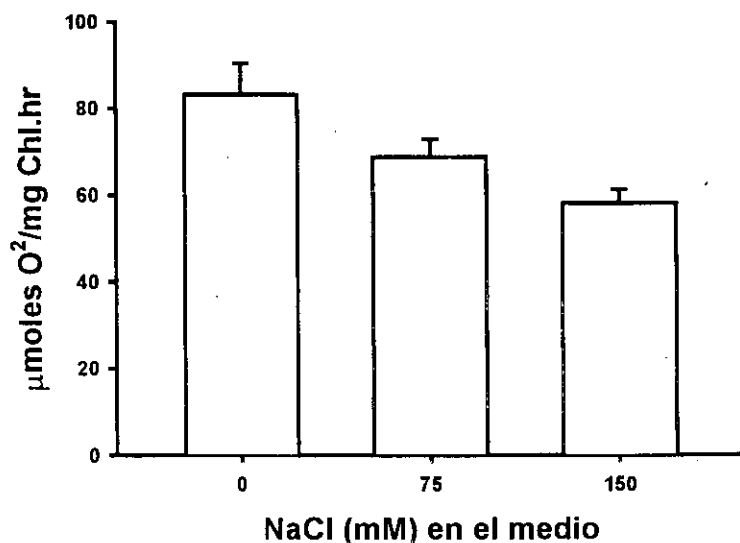


Figura 20

Efecto de la salinidad en el transporte electrónico desde el agua, en PSII hasta el Metil Viologen, en PSI, en tilacoides aislados de *Triticum aestivum* cv. Pavón, a los 28 días después de la siembra en cada uno de los tratamientos. n=5

La figura 20 muestra el transporte electrónico *in situ*, medido en tilacoide aislado. Los electrones fluyen desde el agua, en PSII, hasta un aceptor artificial (Metil Viologeno) que los recibe en el lado aceptor de PSI, a nivel de la Ferredoxina oxido/reductasa. Se puede observar una disminución en el transporte electrónico conforme aumenta la salinidad en el medio de cultivo. Las plantas expuestas a 75 mM se mantienen sin diferencias con respecto a las plantas control y las crecidas en 150 mM de NaCl. Estos datos corroboran lo encontrado *in vivo*.

Por otro lado, la Figura 21 muestra el acarreo entre citocromo b/f y PSI, medido en tilacoides aislados, usando donadores (DCPIP y ácido ascórbico) y aceptores (metil viologeno) artificiales. Como se puede observar, para ambos tratamientos con estrés salino, la velocidad de acarreo electrónico disminuye significativamente con respecto al control, indicando una afectación directa sobre los acarreadores electrónicos entre el citocromo b/f y la ferredoxina oxido/reductasa en PSI. Esta disminución de la velocidad de acarreo electrónico en PSI provocaría *in vivo*, un atraso en la oxidación de PSII, y por lo tanto un aumento en la presión de reducción de QA, lo cual encendería mecanismos para liberar el exceso de energía en los centros de

reacción. Esto concuerda con el aumento de liberación de energía vía una ruta no-fotoquímica o térmica (Figura 18).

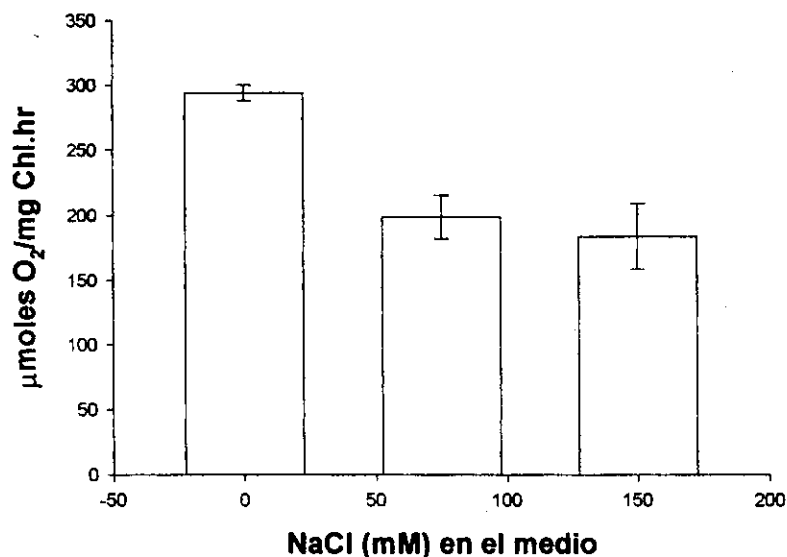


Figura 21

Efecto de la salinidad en el transporte electrónico desde el agua, en PSII, hasta el Metil Viologeno, en PSI, en tilacoides aislados de *Triticum aestivum* cv. Pavón, a los 28 días después de la siembra en cada uno de los tratamientos. n=5

Sanjay, *et al*, en 1991, trabajando con la variedad HD-2329 de *Triticum aestivum*, salinizado a 100, 300 y 600mM de NaCl durante siete días, no encuentran diferencias en el acarreo electrónico medido en tilacoides aislados, concluyendo que la salinidad no tiene efectos directos en el transporte electrónico fotosintético. Guenter y Melis, en 1987, y Shabala *et al.*, en 1998, trabajando con espinaca y maíz, respectivamente encontraron datos similares.

Es importante notar que en los trabajos antes mencionados las plantas no fueron crecidas en NaCl, sino que el estrés fue impuesto en un momento específico del crecimiento de la planta y por períodos de tiempo cortos, a diferencia de esta investigación, en donde las plantas germinan y crecen hasta la mitad de su etapa vegetativa en presencia de NaCl. Lo reportado en esta investigación es resultado de una adaptación de las plantas al estrés y no producto de un shock iónico u osmótico. Maslenkova, *et al.*, en 1993, realizan un trabajo similar a éste, con cebada, y concluyen que la exposición prolongada a la sal conlleva a una adaptación al estrés. La adaptación en esta planta sometida al estrés salino involucra un incremento significativo de la síntesis de ácido abscísico (ABA) en las hojas y alguna clase de reorganización de la membrana tilacoidal que permite la estabilización de la función fotoquímica.

Critchely, en 1983, encontró en tilacoides aislados de halófitas, una estimulación *in vitro* del acarreo electrónico, al incrementar las concentraciones de NaCl en la celda de ensayo. Wignarajah y Baker, en 1981, encuentran algo similar en tilacoides aislados de glicófitas salinizadas. En esta investigación también se encontraron datos similares, sin embargo, cuando no se añade sal al medio de reacción,

el acarreo electrónico es menor en los tilacoides provenientes de plantas salinizadas.

E. Tamaño relativo de Qa y Plastoquinona

El tamaño relativo de la poza de Qa, o el número de centros de reacción conectados a Qa se pueden calcular del área que se forma sobre la curva de inducción de fluorescencia en muestras inhibidas con DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) (Figura 4). El tamaño de la poza de plastoquinona se obtiene del área sobre la curva de fluorescencias de F_0 a F_m en muestras no inhibidas pero totalmente reducidas en sus acarreadores por incubación a la oscuridad, menos el área obtenida de las muestras inhibidas con DCMU (Mohanty ,*et al.*, 1991; Horton y Bowyer, 1990; Kurreck, *et a.l.*, 2000) (Figura 4).

La Figura 22 muestra el tamaño relativo de la poza de quinona A en el PSII. Ésto mismo nos indica el número de centros de reacción por mg de clorofila. Como se puede observar, el tamaño de QA o de centros de reacción aumenta con la salinidad. La Figura 23 muestra el tamaño relativo de la poza de plastoquinona por mg de clorofila. Se observa también el mismo patrón encontrado para la poza de QA, la

salinidad provoca un aumento de ambos acarreadores en las plantas estresadas.

Hibino, *et al*, en 1996, trabajando con una cianobacteria halotolerante (*Aphanothece halophytica*), reportan un aumento en la clorofila *a* y del número de PSI; sin embargo, no encuentran diferencias entre el número de fotosistema II y citocromo *b/f*.

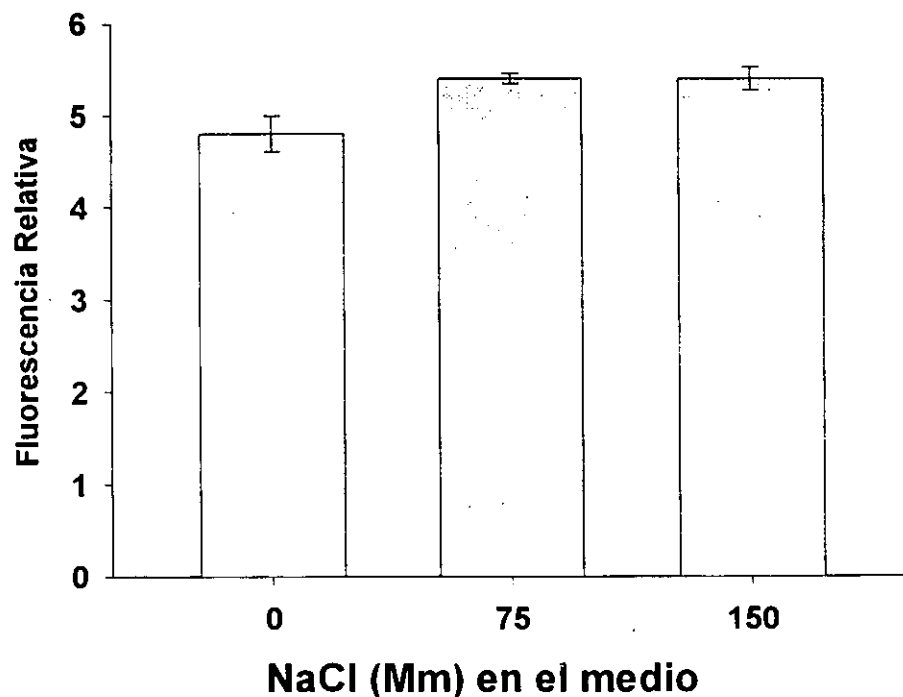


Figura 22

Efecto de la salinidad sobre el tamaño relativo de la poza de Quinona A en *Triticum aestivum* cv. Pavón, a los 28 días después de la siembra en cada uno de los tratamientos $n=14$

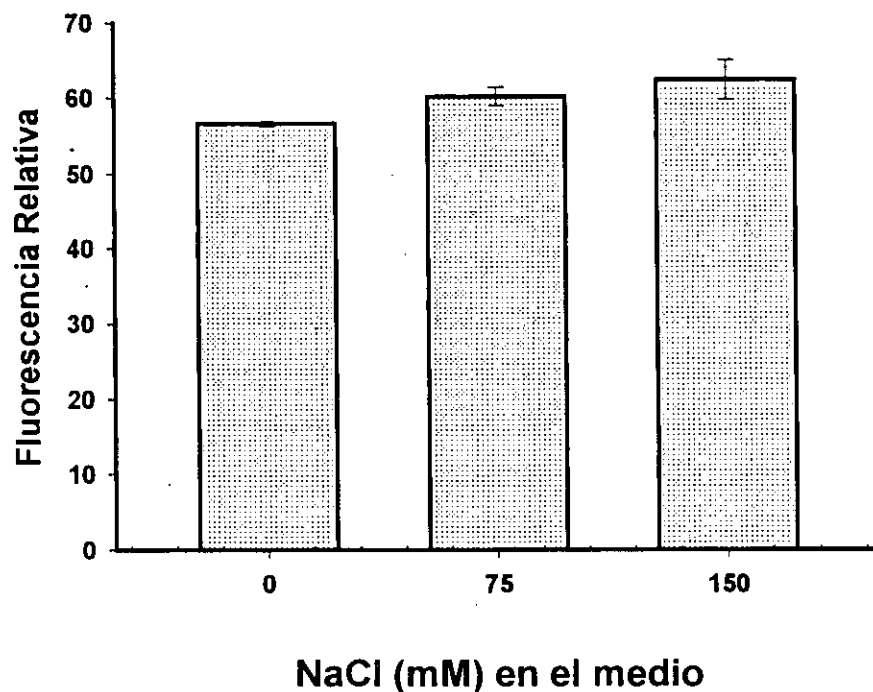


Figura 23
 Efecto de la salinidad sobre el tamaño relativo de la poza de Plastoquinona en *Triticum aestivum* cv. Pavón a los 28 días después de la siembra según el tratamiento. n=14

Guenther y Melis, en 1987, trabajando con espinaca salinizada, no encuentran cambios en PSII, PSI y Cyt b/f, con respecto a las plantas control. No encontramos bibliográficamente una investigación que relacione el tamaño de QA o PQ con la salinidad. Los datos de las gráficas presentadas en el artículo de Satoh, *et al.*, 1983 son similares a los de esta investigación, sin embargo ellos no hacen referencia a la poza de alguno de estos acarreadores.

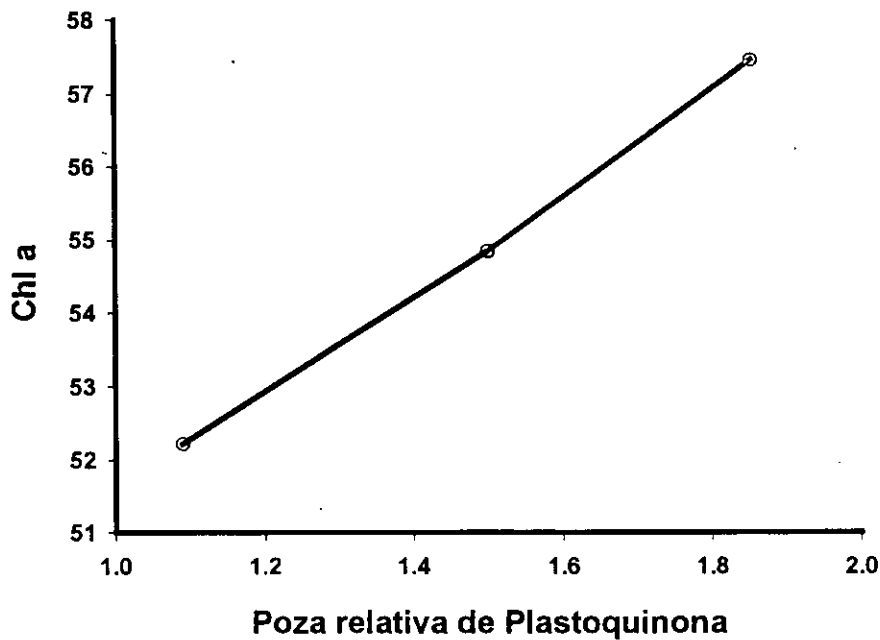


Figura 24

Relación entre el aumento de Clorofila a y la poza relativa de Plastoquinona en plantas salinizadas de *Triticum aestivum* cv. Pavón. n=5

Por otro lado, en la Figura 14 podemos observar que el incremento de la relación de la clorofila a/b esta dado por un aumento de la clorofila a . Como se discutió, este aumento está relacionado con un cambio de estequiometría entre PSI/PSII y con el grado de apilamiento del PSII. El aumento de plastoquinona encontrado en esta investigación está directamente relacionado con el aumento de

clorofila α ; no se tiene ninguna referencia bibliográfica sobre este hallazgo (Figura 24).

Los cambios encontrados en esta investigación aparentemente son un ajuste fisiológico a las condiciones imperantes de estrés salino que permiten a la planta mantener en funcionamiento la maquinaria fotosintética.

En un escenario donde la fijación de CO_2 estuviera disminuida por cambios estomáticos o el funcionamiento de la vía reductiva de las pentosas, se provocaría una disminución en el uso de los productos de la fase luminosa, a saber ATP y NADPH. El atraso en el reciclado de ADP y NADP^+ podría provocar un estancamiento de los electrones en la cadena transportadora de electrones. Vías como la fotorespiración, la reacción de Mehler y la reducción de otras moléculas podría permitir a la cadena transportadora seguir funcionando, aunque con cierta dificultad. La sobrerreducción de los transportadores de electrones provocaría una duración mayor del estado excitado de las clorofilas, pudiendo formarse especies reactivas en los centros de reacción, lo que a su vez provocaría una fotodestrucción, por lo que la liberación de la energía de excitación por mecanismos no fotoquímicos o por el ciclo de la vióxalantina tendrían al sistema funcionando.

En este escenario, un aumento de la poza de plastoquinona aumentaría la probabilidad de encontrar un acarreador oxidado en el fotosistema II y de esta manera se liberaría la presión de reducción sobre QA.

F. Efecto sobre la liberación de oxígeno

Los electrones que son liberados del centro de reacción del fotosistema II son recuperados por los electrones provenientes de la fotólisis del agua en el complejo liberador de oxígeno. Este sitio, el lado aceptor del PSII, también se ha reportado ser afectado por la salinidad (Satoh, *et al*, 1983).

La Figura 25 muestra el efecto de la salinidad sobre la liberación de oxígeno. Como se puede observar, el tratamiento a 75mM de NaCl es intermedio y no existen diferencias significativas con el control o con el tratamiento a 150 mM. Sin embargo, es menor la liberación de oxígeno en el tratamiento a 150 mM con respecto al control. Esto nos habla de una afectación sobre el lado aceptor de PSII y por lo tanto en la velocidad de reducción de centro de reacción una vez que perdió su electrón.

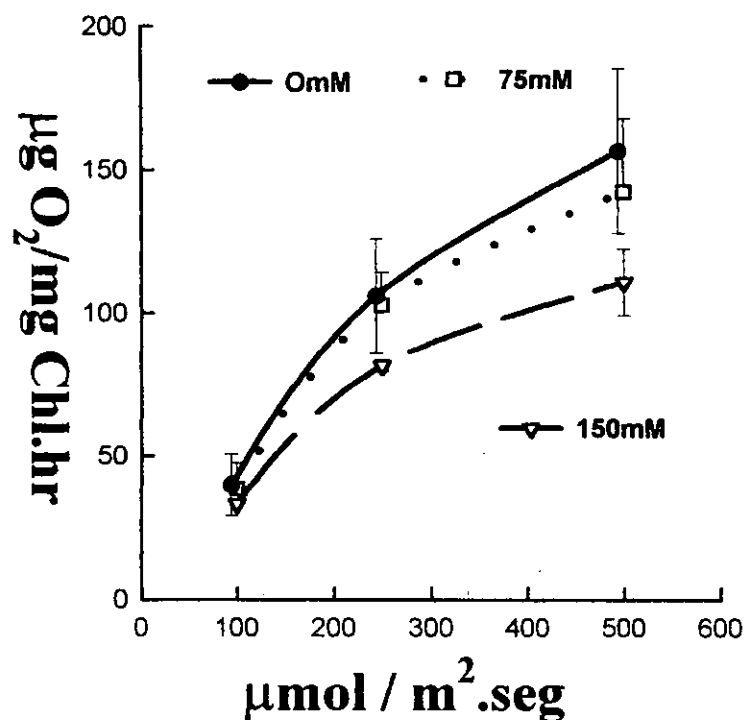


Figura 25

Efecto de la salinidad en la liberación de oxígeno en disco de hoja de *Triticum aestivum* cv. Pavón a los 28 días de la siembra en los diferentes tratamientos. n=3

Maslenkova, *et al.*, en 1993, trabajando con cebada, reportan que la salinización (100 mM) afecta en mayor magnitud al complejo liberador de oxígeno que al centro de reacción de PSII. Keiper, *et al.*, en 1998, trabajando con eucaliptos salinizados, concluye que el lado oxidante

(aceptor) del fotosistema II, donde el oxígeno es liberado, es particularmente sensible a un gran número de estreses, incluyendo la salinidad. Singh y Dubey, en 1995, mencionan que el principal sitio afectado por la salinidad es el fotosistema II.

Por otro lado, se puede observar en la Figura 25 que las plantas que crecieron a 150 mM, comparadas con las plantas control, se saturan a la mitad de la intensidad lumínica. Este hecho corrobora lo encontrado en el incremento de la liberación de energía por procesos no fotoquímicos en las plantas salinizadas a 150 mM de NaCl (ver Figura 19). Everad, *et al.*, en 1994, trabajando con un cereal con ascendencia halófila, *Apium graveolens*, encontraron que el punto de saturación lumínica para la fijación de CO₂ disminuye, mientras que punto de compensación lumínica aumentaba.

Downtow, *et al.*, en 1985, en sus investigaciones con espinaca salinizada a 250 mM de NaCl, encontraron un patrón muy similar, tanto para la liberación de oxígeno como para la fijación de CO₂. Rajasekaran, *et al.*, en 1997, trabajando con la variedad Sun-9-E de *Triticum aestivum*, encontraron que la salinidad a 150 mM disminuye la tasa neta de fijación de CO₂ (μmoles/m².seg) en un 35%. El análisis de las pendientes de la tasa neta de fijación de CO₂ (μmoles/m².seg)

contra diferentes concentraciones CO_2 interno (C_i) indican que la disminución de la fijación no está dado únicamente por la reducción de la conductancia estomática, sino por una disminución de la actividad o la regeneración de la enzima carboxilante, la RubisCO. Es importante mencionar que para esta investigación con la variedad Pavón, durante las mediciones de liberación de oxígeno se utilizó una atmósfera saturante de CO_2 (2%), por lo que las diferencias que se pudieran presentar en la conductancia estomática, producto del estrés salino, no resultan en un factor limitante para la liberación de oxígeno dependiente de la fijación de CO_2 . Seeman y Critchley, en 1985, trabajando con frijol común en un ambiente saturante de CO_2 , en donde no habría limitaciones estomáticas, encontraron que la salinidad reduce en un 25% el rendimiento cuántico para la fijación de CO_2 . La estequiometría bioquímica del proceso indica que por cada oxígeno liberado, se sintetizan 3 ATP y 2 NADPH, los cuales son usados para la fijación de una molécula de CO_2 . Seeman y Critchley (1985), concluyen que la disminución del rendimiento cuántico para CO_2 , pudiera estar asociada a procesos que involucran la cosecha de luz, el transporte electrónico y/o la fotofosforilación oxidativa. Miteva, *et al*, en 1992, trabajando con una glicófita tolerante, la cebada, encuentran

que la salinidad disminuye la tasa de fijación de CO₂, así como la síntesis de proteínas, particularmente la síntesis de la Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa oxigenasa, cuya actividad se abate en un 80%.

Por otro lado, es importante reconocer que el ambiente iónico en el cloroplasto es crucial para el funcionamiento normal de las reacciones luminosas primarias (Wignarajah y Baker, 1981). Se reconoce que gran parte de las sales acumuladas en el citoplasma de las plantas salinizadas se distribuye en cloroplasto y vacuola. Robinson, *et al*, en 1983 trabajando con espinaca salinizada a 200mM de NaCl encontraron que el sodio se acumula en los cloroplastos en 1.7 veces. En las muestras salinizadas se pierde el 42% del potasio, comparado con el control. Demming y Winter, en 1986 encontraron datos similares en la halófito *Mesembryanthemum crystallinum*. Esta planta, al ser crecida en NaCl (400 mM), acumula hasta 234 mM de Na⁺, 117 veces más que lo encontrado en el control. En cuanto al potasio, el cloroplasto pierde el 70%, comparado con las muestras control. Brugnoli y Bjorkman, en 1992, en sus trabajos con algodón sugieren que una característica de tolerancia es el mantenimiento de un adecuado nivel de potasio en el tejido foliar, ya que esto es crucial

para mantener la integridad de los sistemas fotosintéticos bajo un estrés salino.

Por lo anterior, es importante reconocer que aún cuando la salinidad o la acumulación de iones tóxicos en la planta pudiera tener efectos directos en procesos no estomáticos, esto es, sobre el complejo antena, el complejo liberado de oxígeno, el centro de reacción de PSII, los acarreadores de PSII, el pool de quinonas, el citocromo b/f o el fotosistema I y cada uno de sus componentes, también los efectos pudieran presentarse al mismo tiempo en las enzimas y en las reacciones del ciclo reductivo de las pentosas o sobre procesos estomáticos. Es un hecho entonces que sin importar en donde se de la modificación, la energía que llega a los sistemas se encontrará en exceso, porque los sistemas que funcionan después de la captura de los fotones (acarreo electrónico, síntesis de NADPH, ATP y fijación de CO₂) se encuentran afectados o disminuídos en su eficiencia. De este modo, el proceso de adaptación tenderá a regular el exceso de energía que llega a los sistemas cosechadores de luz, la primera línea del proceso fotosintético, evitando de esta manera que se dañen irreversiblemente.

Por lo anterior, de los resultados obtenidos en ésta investigación podemos resumir lo siguiente:

1. La germinación se reduce en un 50% en presencia de 200mM de NaCl en el medio. Por esta característica, el cultivar "Pavón" puede ser considerado como medianamente tolerante a la salinidad
2. En la raíz de las plantas estresadas se encuentra hasta el 50% del sodio total acumulado en la planta. El calcio y magnesio se pierden de la raíz, pero el potasio nunca deja de acumularse, siendo ésto prueba de la integridad de la membrana. La pérdida de calcio y magnesio en la raíz al parecer es producto de un intercambio iónico en la pared celular. La acumulación de sodio es producto de la pérdida de selectividad de la membrana entre Na^+ y K^+ y no de la integridad de la misma.
3. En el tallo se encuentra hasta el 25% del sodio acumulado en las plantas estresadas, impidiendo de esta manera su paso al tejido foliar. El potasio se acumula en altas concentraciones en el tallo, posiblemente participando en la osmoregulación.
4. En las plantas estresadas el sodio se acumula en las hojas más adultas y el potasio nunca deja de acumularse, a menos que el sodio alcance niveles por encima de los 0.5mmoles/g Peso Seco.

La pérdida de calcio y magnesio en la hoja al parecer es producto de un intercambio iónico en la pared celular. La baja acumulación de sodio en las hojas más jóvenes permite que el proceso fotosintético no se vea afectado y la tasa de crecimiento no disminuya.

5. La salinidad provoca un aumento de clorofila "a". Según la literatura, esto induciría una disminución del grado de apilamiento de los cloroplastos y una reducción del tamaño de los complejos antena, reduciéndose de esta manera la absorbancia del organelo.
6. La salinidad induce un incremento en el tamaño relativo de la poza de plastoquinona y en menor grado de la poza de QA.
7. La salinidad provoca una reducción en la fluorescencia máxima y mínima en la misma proporción, lo cual está asociado a una liberación de energía, a través de un cambio de estado o un evento de "spill over", todo esto con el propósito de disminuir la presión de reducción sobre QA (1-qP), sin disminuir la eficiencia fotoquímica de PSII (Fv/Fm)
8. El producto del trabajo fotoquímico (qP) no se modifica por el estrés salino, siendo esto evidencia de un control sobre la presión de reducción de QA (1-qP); esto está asociado al hecho de que la

liberación de energía de excitación por procesos no fotoquímicos (qNP) se incrementa a flujos fotónicos más bajos que el control.

9. En tilacoide aislado la salinidad afecta el transporte electrónico desde el agua hasta PSI y desde el citocromo b/f hasta PSI. *In vivo* la salinidad afecta la velocidad de flujo electrónico entre el centro de reacción y la quinona A , así mismo entre la quinona A y la quinona B.
10. La salinidad afecta la liberación liberación de oxígeno *in vivo*.

Conclusión:

En resumen, la tolerancia a la salinidad presentada por *Triticum aestivum* variedad Pavón depende de una eficiente selectividad en la toma de sodio y el potasio, una distribución de los iones en la raíz, tallo y hojas adultas a fin de no afectar las zonas de crecimiento y una continua acumulación de potasio como un factor importante en la tolerancia de este cultivar.

La regulación de la energía fotosintética de excitación bajo condiciones de estrés se da a través de una disminución de la absorbancia del cloroplasto, un incremento de la liberación de energía por procesos no fotoquímicos, procesos de cambio de estado o "spill over" y por un incremento de la poza de plastoquinona, todo con el fin de disminuir la presión de reducción en QA y el centro de reacción de PSII al encontrarse reducido el acarreo electrónico y la liberación de electrones en el complejo liberador de oxígeno por la salinidad.

BIBLIOGRAFIA :

Allen, J.F. y Holmes, N.G. (1986) Electron transport and redox tritiation. En *Photosynthesis : Energy transducction. A Practical aproach.* Ed. Hipkins, M.F. y Baker, N.R. IRL Press. Oxford.

Anderson, J.M. (1986). Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. *Annual Review of Plant Physiology.* 37:93-136.

Aro, E.M., Virgin, I., y Andersson, B. (1993). Photoinhibition of photosystem II, inactivation, protein damage and turnover. *Biochemical et Biophysica Acta.* 1143: 113-134.

Asada, K. y Takahashi, M. (1987). Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. En *Photoinhibition.* Ed Kyle, D.J. et al. Elsevier Science Publisher. England. pp 228-290.

Ashour, N.I. y Thalooth, A.T. (1989). Photosynthetic apparatus of *Beta vulgaris saccharifera* as affected by chloride salinity. *Plant Physiology suplement.* A60.

Baker, N.R. y Horton, P. (1987). Chlorophyll fluorescence quenching during photoinhibition. En *Photoinhibition.* Ed Kyle, D,J. et al. Elsevier Science Publisher. England. pp. 228-290.

Baker, N. R. (1991). A possible role for photosystem II in enviromental pertubation of photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 81: 563-570.

Baker, N. R. y Ort, D. R. (1991). Light and Crop Photosynthetic performance. En *Crop Photosynthesis: Spatial and temporal determination.* Elsevier Science Publisher. England. pp: 290-312.

Baker, N.R. (1992). Light-use efficiency and photoinhibition of photosynthesis. Abstract. No. p5.23. Lancaster Meeting 1992. *Plant Responses to water deficits-from cell to community.* Experimental Botany.

Bañuls, J. y Primo-Millo, E. (1992). Effects of chloride and sodium on gas exchange parameters and water relations of *Citrus* plants. *Physiologia Plantarum*. 86: 115-123.

Beckett, R.P. y Van Staden, J. (1992). The effect of Thidiazuron on the yield of salinity stressed wheat. *Annals of Botany*. 70:41-51.

Begum, F. Karmoker, J.L. Fattah, Q.A. y Maniruzzaman, A.F.M. (1992). The effect of salinity in germinating and its correlation with K^+ , Na^+ , Cl^- accumulation in germinating seed of *Triticum aestivum* L. cv. Akbar. *Plant Cell Physiology*. 33(7): 1009-1014.

Bernstein, N., Silk, W., Lauchli, A. (1995). Growth and development of sorghum leaves under condition of NaCl stress: possible role of some minerals elements in growth inhibition. *Planta* 196:699-705.

Bjorkman, O. (1987). High-irradiance stress in higher plants and interactions with other stress factors. In Biggins, J. (ed). *Progress in Photosynthesis Research*. Vol 4:11-18. Martinus Nijhoff. Publisher. Dordrecht-Boston-Lancaster.

Bolhar-Nordenkamp H.,R., y Oquist G., (1998). Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. En *Photosynthesis and production in a changing environment: A field and laboratory manual*. Ed. D.O. Hall y M.O. Scurlock. Champan and Hall Publisher. London. p 193-206

Bongi, G., y Loreto F. (1989). Gas-Exchange properties of salt-stressed olive (*Olea europea* L.) leaves. *Plant Physiologi* 90:1408-1416

Botella, M.A., Cerdá, A.C., y Lips, S.H. (1993). Dry matter production, yield and allocation of Carbon-14 assimilates by Wheat as affected by Nitrogen source and salinity. *Agronomical Journal*. 85: 1044-1049.

Brugnoli, E. y Bjorkman, O. (1992). Growth of cotton under continuous salinity stress: influence on allocation pattern, stomatal and non-stomatal componentes of photosynthesis and disipation of excess light energy. *Planta* 187:335-347

Brugnoli, E., y Lauteri, M. (1991) Effects of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity and carbon isotope discrimination of salt-tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and salt-sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C₃ non-halophytes. *Plant Physiology* 95:628-635.

Cajuste, L.J. (1977). *Química de suelos con un enfoque agrícola*. Talleres gráficos de la Nación. México. pp 131-132.

Carter, D.R. y Cheeseman, J. M. (1993). The effects of external NaCl on thylakoid stacking in lettuce plants. *Plant, Cell and Environment*. 16: 215-222.

Cheeseman, J.M. (1988). Mechanism of salinity tolerance in plants. *Plant Physiology*. 87:547-550.

Chow, W. S., Melis, A., y Anderson, J.M. (1990). Adjustments of photosystem stoichiometry in chloroplast improve the quantum efficiency of photosynthesis. *Proceedings of National Academic of Science of USA*. 87:7502-7506.

Christiansen, M.N. y Lewis, Ch. (1987). *Mejoramiento de plantas en ambientes poco favorables*. Limusa, México. pp 9-21 y 173-210.

Clarkson, D.T. (1986). Movements of ions across roots. En *solute transport in plant cells and tissues*. Ed. Baker. D.A. and Hall, J.L. Longman Scientific and Technical. New York. pp 251-303.

Colmer, T.D., Epstein, E. y Devorak, Y. (1995). Differential solute regulation in leaf blades of various ages in salt-sensitive wheat and salt-tolerant wheat *Lophopyrum elongatum* (Host). A. Love, amphiploid. *Plant Physiology* 108:1715-1724.

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

Cramer, G.R., Lauchli, A., y Polihio, V. S. (1985). Displacement of Ca²⁺ by Na⁺ from the plasmalemma of root cell. *Plant Physiology*. 79:207-211.

Critchley, C. (1983) Further studies on the role of chloride in photosynthesis O_2 evolution in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 724:1-5.

Davenport, R.J., Reid, R.J., y Smith, F.A. (1997). Sodium calcium interactions in two wheat species differing in salinity tolerance. *Physiologia Plantarum*. 99:323-327.

Demming, B., y Winter, K. (1986). Sodium, potassium, chloride and proline concentrations of chloroplasts isolated from halophyte, *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta* 168:421-426.

Demming-Adams, B., y Adams, W.W. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in plant science*. 1(1):21-26

Delane, R., Greenway, H., Munns, R., y Gibbs, J. (1982). Ion concentration and carbohydrate status of the elongating leaf tissue of *Hordeum vulgare* growing at high external NaCl. *Journal of Experimental Botany*. 135(33):557-573.

Downton, W.J., Grant J.R., y Robison, S. P. (1985). Photosynthetic and stomatal responses of spinach leaves to salt stress. *Plant Physiology*. 77: 85-88.

Durand M., y Lacan, B. (1994). Sodium partitioning within the shoot of soybean. *Physiologia Plantarum* 91:65-71.

Epstein, E. y Norlyn, J.D. (1980). Saline culture of crops: A genetic approach. *Science* 24(210): 399-404.

Everard, J.D., Gucci, R., Kann, S.C., Flore, J.A., y Loescher, W. H. (1994). Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L.) at various levels of root zone salinity. *Plant Physiology* 106:281-292.

Falk, S., Krol, M., Maxwell, D., Rezansoff, G., Gray, G., y Huner, P. (1994). Changes in in vivo fluorescence quenching in rye and barley as

a function of reduced PSII light harvesting antenna size. *Physiologia Plantarum* 91:551-558.

Francois, L.E., Grieve, C.M, Maas, E.V. y Lesch, S.M. (1994). Time of salt stress affects growth and yield components of irrigated wheat. *Agronomical Journal*. 86: 100-107.

García, A., Rizzo, C.A., Ud-Din, J., Bartos, S.L., Sendhira, D., Flowers, T.J. y Yeo A.R. (1997). Sodium and potassium transport to the xylem are inherited independently in rice and the mechanism of sodium: potassium selectivity differs between rice and wheat. *Plant Cell and Environment* 20:1167-1174

Gale, J. y Zeroni, M. (1985). The cost to plants of different strategies of adaptation to stress and the alleviation of stress by increasing assimilation. *Plant and Soil* 89: 57-67.

Genty, B., Briantais, J-M. y Baker, N.R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*. 990: 87-92.

Gerst, U., Schonknecht, G., y Heber, U. (1994). ATP and NADPH as the driving force of carbon reduction in leaves in relation to thylakoid energization by light. *Planta*. 193:421-429.

González, M.S. y Peñaloza, I. (1984). *Manual de Biomoléculas*. UNAM-Campus Iztacala. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla. Edo. México.

González, M.S. y Perales V. H. (1993). Efecto de NaCl sobre el flujo electrónico fotosintético en tilacoide aislado de *Avicenia germinans*. XIII Coloquio de Investigación. UNAM-Campus Iztacala. Edo. México.

Gorham, J., Jones, W.R.G. y McDonnell, E. (1985). Some mechanisms of salt tolerance in crop plants. *Plant and Soil* 89:15-40.

Gorham, J., Forster, B.P. Budrewicz, E., Wyn Jones, R.G., Miller, T.E. y Law, C.N. (1986). Salt tolerance in the Triticeae: Solute accumulation and distribution in an amphidiploid derived from *Triticum aestivum* cv.

Chinese spring and *Thinopyrum bessarabicum*. Journal of Experimental Botany. 183(37):1435-1449.

Gorham, J. Bristol, A., Young, E.M. Jones, W.R.G., y Kashour, G. (1990). Salt tolerance in the Triticeae: K/Na Discrimination in barley. Journal of Experimental Botany. 41(230):1095-1101.

Gorham, J. (1994). Salt tolerance in the Triticeae: K/Na discrimination in some perennial wheat grasses and their amphiploids with wheat. Journal of Experimental Botany. 45(273):441-447.

Gorham, J. And Bridges, J. (1995). Effects of calcium on growth and leaf ion concentration of *Gossypium hirsutum* growth in saline hidroponci culture. Plant and Soil. 176:219-227.

Gorkom, H. Van (1986). Fluorescence measurements in the study of photosystem II electron transport. En Light Emission by plants and bacteria. Ed. Govindjee et al. Academic Press. Orlando.

Guenther, J.E. y Melis, A. (1987). Targets of salinity stress in spinach. En Progress in Photosynthesis Research Vol. IV. Ed. Biggens. J. Martinus Nijhoff Publisher. Netherlands.

Greenway, H. y Munns, R. (1980). Mechanism of salt tolerance in non-halophytes. Annual Review of Plant Physiology. 31:149-190.

Hall, D. O., y Scurlock, M.O. (1993). Photosynthesis and production in a changing environment: A field and laboratory manual. Chapman & Hall. London.

Heber, U., Schreiber, U., Siebke, K., y Dietz, K.J. (1990). Relationship between light driven electron transport, carbon reduction and carbon oxidation in photosynthesis. En Perspectives in biochemical and genetic regulation of photosynthesis. Ed Zelitch, Y. Wiley-Liss. USA. p. 17-38

Heber, U. y Walker, D. (1992). Concerning a dual function of coupled cyclic electron transport in leaves. Plant Physiology. 100: 1621-1626.

Hernández, J.A., Olmos, E., Corpas, F.J., Sevilla, F., y del Río L.A. (1995). Salt induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science* 105:151-167.

Hibino, T., Lee, H.B., Rai, A.K., Ishikawa, H., Kojima, H., Tawada, M., Shimoyama, H., y Takabe, T. (1996). Salt enhances photosystem I content and cyclic electron flow in NAD(P)H dehydrogenase in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Australian Journal of Plant Physiology*. 23:321-30

Hipkins, M.F. y Baker, N.R. (1986). Spectroscopy. En *Photosynthesis: Energy transduction. A practical approach*. Ed. Hipkins, M.F. y Baker, N.R. IRL Press. Oxford.

Horton, P., Noctor, G., y Rees, D. (1990). Regulation of light harvesting and electron transport in photosystem II. En *Perspectives in Biochemical and Genetic regulation of photosynthesis*. Ed. Zelitch, Y. Wiley-Liss. USA. p. 145-158.

Horton, P. y Bowyer, J.R. (1990). Chlorophyll fluorescence transients. En *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 4. Ed. Harwood, J.L. y Bowyer, J.R.. Academic Press. London.

Horton, P. y Ruban, A.V. (1992). Regulation of photosystem II. *Photosynthesis Research*. 34:375-385.

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

Jescke, W.D., y Nassery, H. (1981). K⁺-Na⁺ selectivity in roots of *Triticum*, *Helianthus* and *Allium* 52:217-224.

Johnson, G.N., Young, A.J. Scholes, J.D. y Horton, P. (1993). The dissipation of excess excitation energy in British plant species. *Plant Cell and Environment*. 16:673-679.

Kafkafi, U., Bernstein, N. (1996). Root growth under salinity stress. En *plant Roots*. Eds. Waisel Yoav Eshel, Amram y Kafkafi Uzi. Marcel Dekker Inc. New York. pp 435-451.

- Keiper, F.J., Chen, D.M. y Filippis, L.F. (1998). Respiratory, photosynthetic and ultrastructural changes accompanying salt adaptation in culture of Eucalyptus. *Journal of Plant Physiology*. 152:564-573.
- Kent, L.M. y Lauchli, A. (1985). Germination and seedling growth of cotton: salinity-Calcium interaction. *Plant Cell and Environment*. 8:155-159.
- Kingsbury, R.W, Epstein, E. y Percy R. (1984). Physiological responses to salinity in selected lines of Wheat. *Plant Physiology*. 74:417-4423.
- Kingsbury, R.W. y Epstein, E. (1986). Salt sensitivity in Wheat. *Plant Physiology*. 80:651-654.
- Kinraide, T.B. (1999). Interaction among Ca^{2+} , Na^{+} and K^{+} in salinity toxicity: quantitative resolution of multiple toxic and ameliorative effects. *Journal of Experimental Botany*. 50(338):1495-1505.
- Kooten, O.V. y Snel, J.F.H. (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, 25:147-150.
- Krall, J. y Edwards, G. (1992). Relation between photosystem II activity and CO_2 fixation in leaves. *Physiologia Plantarum*. 86: 180.187.
- Krause, G.H. (1988). Photoinhibition of Photosynthesis: An evaluation of damaging and protective mechanism. *Physiologia Plantarum*. 74:566-574.
- Krause, G.H. y Somersalo, S. (1989). Fluorescence as a tool in photosynthesis research: Application in studies of photoinhibition, cold acclimation and freezing stress. *Phil. Trans. R. Soc. London*. B-323:281-293.
- Krause, G.H. y Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Physiology*. 42:313-349.

- Krishnaraj, S., Mawson, B.T., Yeung, E.C., y Thorpe, T.A. (1992). Utilization of induction and quenching kinetics of chlorophyll "a" fluorescence for in vivo salinity screening studies in wheat (*Triticum aestivum* vars. Kharchia-65 and fielder). *Canadian Journal of Botany*. 71:87-92.
- Kurreck, J., Schodel, R., y Renger G. (2000). Investigation of the plastoquinone pool size and fluorescence quenching in thylakoid membranes and photosystem II (PSII) membrane fragments. *Photosynthesis Research* 63:171-182.
- Lacan, D, y Durand, M. (1996). Na⁺-K⁺ exchange of the xylem/symplast boundary: Its significance in the salt sensitivity of soybean. *Plant Physiology* 110:705-711.
- Leigh, R.A., y Wyn, Jones, R.G. (1984). A hipotesis relating critical potassium concentration for growth to the distribution and functions of this ion in plant cell. *New Phytology*. 97:1-13.
- Li Xia-Ping y Ong Bee-Lian (1998). Responses of photosynthesis to NaCl in gametophytes of *Acrostichum aureum*. *Physiologia Plantarum* 102:119-127.
- Long, S. P. y Baker, N.R. (1986). Saline terrestrial environments. En *Photosynthesis in Contrasting environments*. Ed. N.R. Baker, y S.P. Long. Elsevier Publisher. United Kindom.
- Longstreth, D. J. y Nobel, P. (1979). Salinity effects on leaf anatomy. *Plant Physiology*. 63:700-703.
- Magdy, M, Mansour, F, Lee-Stadelmann, O., y Stadelmann, E. (1993). Solute potential and cytoplasmic viscosity in *Triticum aestivum*, and *Hordeum vulgare* under salt stress. *Journal of Plant Physiology*. 142:623-628.
- Martínez, V., Bernstein, N., y Lauchli, A. (1996). Salt induced inhibition of phosphorus transport in lettuce plants *Physiologia Plantarum*. 97:118-112.

- Maslenkova, L.T., Zanev, Y., y Popova, L.P. (1993). Adaptation to salinity as monitored by PSII oxygen evolving reactions in barley thylakoids. *Journal of Plant Physiology* 142:629-634.
- Match, T., Matsushita, N. y Takahashi, E. (1988). Salt tolerance of the red plant *Pharagmites communis*. *Physiologia Plantarum*. 72:8-14.
- Mckiernan, M. y Baker, N.R. (1991). Adaptation to shade of the light-Harvesting apparatus in *Silene dioica*. *Plant Cell and Enviorement*. 14:205-212.
- Melis, A. (1991). Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1058: 87-106.
- Miteva, T.S., Zhelev, N.Zh., y Popova, L.P. (1992). Effect of salinity on the synthesis of Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxigenase in barley leaves. *Journal of Plant Physiology*. 140:46-51.
- Mohanty, N., Bruce, D., y Turpin D.H. (1991). Dark ammonium assimilation reduces the plastoquinone pool of photosystem II in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiology* 96: 514-517
- Mozafar, A. y Goodin, J. R. (1986). Salt tolerance of two differently drought-tolerant wheat genotypes during germination and early seedling growth. *Plant and Soil*, 96:303-316.
- Munns, R., Delane, G.R., y Gibbs, J. (1982). Ion concentration and carbohidrate status onf the elongating leaf tissue of *Hordeum vulgare* growing at high external NaCl. *Journal Experimental Botany*. 33(135): 574-583.
- Munns, R. (1985) Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in xylem sap flowing to shoots of NaCl-treated Barley. *Journal of Experimental Botany*. 36(168):1032-1042.
- Narendra, K. (1989). Changes in chloroplast structure and function in salt-adapted tobacco cells. *Plant Physiology Supplement*. 76:28.

Neale, P.J. y Melis A. (1989). Salinity stress enhances photoinhibition of photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Plant Physiology*. 134:619-622.

Neumann, P.M., Van Volkenburgh, E. y Cleland E. R. (1988). Salinity stress inhibits bean leaf expansion by reducing turgor, not wall extensibility. *Plant Physiology* 88:233:237.

Ogren, E. y Rosenqvist, E. (1992). On the significance of photoinhibition of photosynthesis in the field and its generality among species. *Photosynthesis Research*. 33:63-71.

Oquis, G. y Chow, W.S. (1992). On the relationship between the quantum yield of photosystem II electron transport, as determined by chlorophyll fluorescence and quantum yield of CO₂ dependent O₂ evolution. *Photosynthesis Research*. 33:51-62.

Pammenter, N.M., Loreto, F., y Sharkey, D.T. (1993). End product feedback effects on photosynthetic electron transport. *Photosynthesis Research*. 35: 5-14.

Panneerselvam, R., Muthukumarasamy, M., y Karikalan, L. (1997). Triadimefon enhances growth and net photosynthetic rate in NaCl stressed plants of *Raphanus sativus*. L. *Photosynthetica* 34(4): 605-609.

Pasternak, D. (1979). Salt resistance in agricultural crops. En *Stress Physiology in Crops Plants*. Ed. H.W. Mussell. pp 127-142. Wiley & Sons. New York.

Percival, M.P. y Baker, N.R. (1985). Comparison of chlorophyll fluorescence emission characteristics of wheat leaf tissue and isolated thylakoids as function of excitation wavelength. *Plant Cell and Enviroment*. 8:41-48.

Pitman, M.G., Lauchli, A., y Stelzer, R. (1981). Ion distribution in roots of barley seedlings measured by electron probe X-ray microanalysis. *Plant Physiology* 68:673-679

Plaut, Z., Grieve, C.M., y Mass, E.V. (1990). Salinity effects on CO₂ assimilation and diffusive conductance of cowpea leaves. *Physiologia Plantarum*. 79:31-38.

Preston, C., Mackie, N.D., Whitecross, M. y Crithcley, C. (1987) Electron microscopic structure and oxygen evolution activity of thylakoids from *Avicenia marina* prepared under different osmotic and ionic conditions. *Plant, Cell and Environment*. 10:95-101.

Munns, R. (1985). Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in xylem sap flowing to shoots of NaCl-treated Barley. *Journal of Experimental Botany*. 168(36):1032-1042.

Rajasekaran, L.R., Kriedemann P.E., Aspinall, D., y Paleg, L.G. (1997). Physiological significance of proline and glicinebetaine: Maintaining photosynthesis during NaCl stress in wheat. *Photosynthetica* 34(3):357-366.

Renger, G. y Schreibe, U. (1986). Practical applications of fluorometric methods to alge and higher plant research. En *Light emission by plants and bacteria*. Ed. Govinjee. et al . Academic Press. Orlando.

Robison, S.P., Downton, J.S. y Millhouse, J.A. (1983). Photosynthesis and ion content of leaves and isolated chloroplast of salt stressed spincah. *Plant Physiology*. 73:238:242.

Romero, J M, Marañón, T., y Murillo, J.M. (1994). Long-term responses of *Melilotus segetalis* to salinity. II, Nutriente absorption and utilization. *Plant Cell and Environment* 17:1249-1255.

Salma, S., Trivedi, S., Busheva, M., Arafa, A., Garab, G., y Erdei, L. (1994). Effects of NaCl salinity on growth, cation accumulation, chloroplast structure and function in wheat cultivars differing in salt tolerance. *Journal of Plant Physiology* 144:241-247.

Sandmann, G., Kuhn, M., y Boger, D. (1993). Carotenoids in photosynthesis: Protection of D1 degradation in the light. *Photosynthesis Research*. 35: 185-190.

Sanjay K. M., Subrahmanyam, D., y Singhal, G. (1991). Interrelationship between salt and light stress on primary process of photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*. 138:92-96.

Saradhi, A.P. y Mohanty, P. (1992). Enhancement of photosystem II photoreaction and high pH stability in thylakoids from cotyledonary leaves of *Brassica juncea* raised under sodium chloride stress. *Physiologia Plantarum*. 86:189-196.

Satoh, K., Smith, C., M., y Fork D.,C. (1983). Effects of salinity on primary process of photosynthesis in the red alga *Porphyra perforata*. *Plant Physiology*. 73:643-647.

Schachtman, D.P. y Munns, R. (1992). Sodium accumulation in leaves of *Triticum* species that differ in salt tolerance.

Schachtman, D.P., Munns, R., y Whitecross, M.I (1991). Variation in sodium exclusion and salt tolerance in *Triticum tauschii*. *Crop Science* 31:992-997

Schreiber, U., Schliwa, U., y Bilger, W. (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research*. 10:51-62.

Seeman, J.R. y Critchley, C. (1985). Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behavior and photosynthetic capacity of salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*. 164:151-162.

Seeman, J.R. y Sharkey, T.,D. (1986). Salinity and nitrogen effects on photosynthesis, Ribulose-1-5-bisphosphate Carboxylase and metabolite pool sizes in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology*. 82:555-560.

Shabala, S. N., Shabala, S.I., Martynenko A. I., Babourina, O., y Newman I, A. (1998). Salinity effect on bioelectric activity, growth, Na⁺ accumulation and chlorophyll fluorescence of maize leaves: a comparative survey and prospects for screening. *Australian Journal of Plant Physiology*. 25:609-616

Shah, S.H., Gorham, J., Forster, y Jones, W.R.G. (1987). Salt tolerance in the Triticeae: The contribution of the D genome to cation selectivity in hexaploid wheat. *Journal of Experimental Botany*. 38(187):254-269.

Sharma, P.K., y Hall, D.O. (1991). Interaction of salt stress and photoinhibition on photosynthesis in barley and sorghum. *Journal of Plant Physiology*. 138:614-619.

Singh, A.K, y Dubey, R.S. (1995). Changes in chlorophyll a and b contents and activities of photosystem 1 and 2 in rice seedlings induced by NaCl. *Photosynthetica* 31(4):489-499.

Smillie, R.M. y Nott, R. (1982). Salt tolerance in crop plants monitored by chlorophyll fluorescence *in vivo*. *Plant Physiology*. 70:1049-1054.

Strasser, R.,T., Srivastava, A., y Govindjee (1995). Polyphasic chlorophyll a, fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology*. 61(1):32-42.

Sultana, N., Ikeda, T., y Itoh R. (1999). Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. *Environmental and Experimental Botany* 42:211-220.

Tyerman, S.D., Skerrett, M., Garril, A., Finday, G.P. y Leigh, R.A. (1997). Pathways for the permeation of Na⁺ and Cl⁻ into protoplast derived from the cortex of wheat roots. *Journal Experimental Botany*. 48:459-480.

Ungar, I. A. (1996). Effects of salinity on seed germination, growth and ion accumulation of *Atriplex patula* (Chenopodiaceae). *American Journal of Botany*. 83(5):604-607.

Virgin, I., Salter, H., Hagman, A., Vass, I., Styring, S., y Andersson, B. (1992). Molecular mechanisms behind light-induced inhibition of photosystem II electron transport and degradation of reaction center polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1101: 139-142.

Velasco, G.R. (1994). Mecanismos de resistencia del frijol mungo (*Vigna radiata*) a la salinidad. Tesis de Maestria en Ciencia.

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencia. Cd. Universitaria. México D.F.

Walker, D. (1986). The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. Robert Hill Institute. University of Sheffield. United Kingdom.

Weimberg, R. (1987). Solute adjustments in leaves of two species of wheat at two different stages of growth in response to salinity. *Physiologia Plantarum* 70:381-388.

Weis, E. y Lechtenberg, D. (1989). Fluorescence analysis during steady-state photosynthesis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B323:253-268.

Whittington, J., y Smith, F.A. (1992). Calcium-salinity interactions affects ion transport in *Chara corallina*. *Plant Cell and Environment*. 15:727-733.

Wingnarajah, K. y Baker, N.R. (1981). Salt induced responses of chloroplast activities in species of different salt tolerance. Photosynthetic electron transport in *Aster tripolium* and *Pisum sativum*. *Physiologia Plantarum* 51: 387-393.

Wolf, O., Munns, R., Tonnet, M.L., y Jescke, W.D. (1991). The role of stem in the partitioning of Na⁺ and K⁺ in salt treated barley. *Journal of Experimental Botany*. 239(42):697-704.

Wolf, O., Munns, R., Tonnet, M.L., y Jescke, W.D. (1990). Concentration and transport of solutes in xylem and phloem along the leaf axis of NaCl treated *Hordeum vulgare*. *Journal of Experimental Botany*, 41(230):1133-1141

Yeo, A.R. (1983). Salinity resistance: Physiology and prices. *Physiologia Plantarum*. 58: 214-222.

Yeo, A.R., Caporn, S.J.M., y Flowers, T.J. (1985). The effect of salinity upon photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.): Gas exchange by individual leaves in relation to their salt content. *Journal of Experimental Botany* 169:1240-1248.

Zsoldos, F. Haunold, E., Vashegyi, A., y Herger, P. (1990). Effects of sodium chloride stress and calcium supply on growth, potassium and calcium supply and internal chloride and sodium levels of winter wheat seedlings. *Acta Biologica Hungarica* 41(4):399-408.