
INTERCAMBIO DE GASES Y RELACIONES HÍDRICAS

DURANTE EL RETRASO DE LA SENESCENCIA FOLIAR DE TRIGO

(*Triticum aestivum* L.) POR LA CITOCININA BAP

Ricardo Martínez-Gutiérrez, Hilda Zavaleta-Mancera, Lucero Del Mar Ruíz-Posadas,
Adriana Delgado-Alvarado y Rocío Vaca-Paulín

RESUMEN

Se estudió el efecto de la citocinina 6-bencilaminopurina (BAP) en el intercambio de gases y relaciones hídricas de *Triticum aestivum* L. durante el retraso de la senescencia foliar en invernadero. Plántulas de 21 días después de la siembra (DDS) fueron asperjadas con BAP 0,1mM o agua (testigo) cada 3 días por 20 días. El retraso de senescencia foliar en las plantas tratadas con BAP fue monitoreado mediante cuantificación de clorofila y proteína soluble total. El intercambio de gases se estimó mediante conductancia estomática (g_s) y tasa de fijación de CO_2 . Las relaciones hídricas se evaluaron midiendo el potencial de agua total (Ψ_A) y sus componentes, osmótico (Ψ_s) y de turgencia (Ψ_t), cada 5 días por 20 días. Las hojas con BAP mostraron mayor concentración de clorofila y proteína total que el

control tras 26 DDS, diferencias que aumentaron con el tiempo y a los 41 DDS fueron 7 veces mayores que el control. La g_s registró valores no significativamente diferentes al estado verde pre-senescente. Estas respuestas se asociaron con tasas mayores de fijación de CO_2 , con concentraciones cercanas a las hojas verdes pre-senescentes ($6,2\mu\text{mol}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). El Ψ_A se mantuvo constante bajo BAP y Ψ_s fue significativamente menor que en los testigos, favoreciendo la retención de solutos en el citoplasma de hojas con retraso de senescencia. El Ψ_t de las hojas tratadas fue mayor que su respectivo testigo de 31 a 41 DDS. Por tanto, la citocinina BAP promovió el mantenimiento de la tasa de fijación de CO_2 y las relaciones hídricas durante el retraso de la senescencia foliar.

Introducción

Durante su evolución, las plantas desarrollaron diferentes mecanismos para prevenir daños producidos por la pérdida de agua. La desecación del vástago, por ejemplo, es evitada a través de mecanismos primarios de defensa como el cierre de los estomas, cambios en el índice de transpiración, incremento de la elasticidad de la pared celular o incrementando la fracción hídrica del apoplasto a través de modificaciones en los componentes del potencial de agua (Pospíšilová *et al.*, 2000). En condiciones de déficit hídrico se inhiben varios procesos fisiológicos, tales como el cre-

cimiento y apertura estomática y, por lo tanto, disminuye el intercambio de CO_2 reduciendo la carboxilación y el transporte de electrones, acelerando la senescencia foliar (Lawlor, 2002).

La secuencia de eventos que ocurren durante la senescencia foliar en plantas monocárpicas es similar a la que ocurre cuando son sometidas a un déficit moderado de agua (-70kPa y -80kPa), debido a que se altera la arquitectura y el estatus hídrico de la planta (Pic *et al.*, 2002), así como la estructura de membranas, originando la degradación de proteínas, clorofilas y finalmente, el desmantelamiento del aparato fotosintético.

La senescencia acompañada por potenciales hídricos bajos, promueve la remobilización de reservas, principalmente las derivadas del nitrógeno. En arroz, la senescencia foliar acelerada por déficit hídrico promueve la distribución de asimilados para el llenado del grano, reduciendo el tiempo de llenado (Yang *et al.*, 2002).

Durante la senescencia las concentraciones de algunas hormonas, tales como las citocininas, disminuyen en las plantas; sin embargo, otras como el etileno y el ácido abscísico (ABA) se incrementan, del mismo modo que cuando existe un déficit hídrico moderado. Los cambios en

las concentraciones hormonales de las plantas son importantes por que son señales de comunicación en respuesta al ambiente entre la raíz y tallo o viceversa (Pospíšilová *et al.*, 2000; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003).

Las citocininas regulan y participan en diferentes procesos fisiológicos y bioquímicos de desarrollo en la planta; se sintetizan principalmente en los meristemos y son transportadas por el xilema. Estas moléculas pueden promover división y alargamiento celular, re-diferenciación de plastidios (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999b), desarrollo de yemas laterales, retraso de la senescencia, movilización de

PALABRAS CLAVE / Citocinina / CO_2 / Potencial Hídrico / Potencial Osmótico / Senescencia /

Recibido: 11/07/2007. Modificado: 18/12/2007. Aceptado: 07/01/2008.

Ricardo Martínez-Gutiérrez. Biólogo, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex). Maestro en Ciencias, Colegio de Postgraduados (COLPOS), Montecillo, México. Estudiante de Maestría en Botánica, COLPOS, Montecillo, México.
Hilda A. Zavaleta-Mancera. Bióloga, Universidad Autó-

noma Metropolitana, México. Maestra en Ciencias, COLPOS, Montecillo, México. Ph.D., University of Wales, Gales, RU. Profesora Investigadora, COLPOS, México. Dirección: Carretera México-Texcoco, Botánica, Colegio de Postgraduados, Km 36.5, Carretera México-Texcoco, CP 56230, Montecillo, Edo. de México,

México. e-mail: arazavaleta@colpos.mx

Lucero del Mar Ruíz-Posadas. Bióloga, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Ph.D., University of Lancaster, Inglaterra, RU. Profesora Investigadora, COLPOS, Montecillo, México.

Adriana Delgado-Alvarado. Química Agrícola, Universidad

Veracruzana, México. Maestra en Ciencias, COLPOS, Montecillo, México. Ph.D. University of Sheffield, Inglaterra, RU. Profesora Investigadora, COLPOS, Puebla, México.

Rocío Vaca-Paulín. Bióloga, UAMex, México. Doctora en Ciencias, UNAM, México. Profesora Investigadora, UAEMex, México.

GAS EXCHANGE AND WATER RELATIONS DURING DELAY OF LEAF SENESCENCE IN WHEAT (*Triticum aestivum* L.) BY CYTOKININ BAP

Ricardo Martínez-Gutiérrez, Hilda Zavaleta-Mancera, Lucero Del Mar Ruíz-Posadas, Adriana Delgado-Alvarado and Rocío Vaca-Paulín

SUMMARY

The effect of cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) on gas exchange and water relationships of *Triticum aestivum* L. during delay of leaf senescence in greenhouse. Plants of 21 days after sowing (DAS) were sprayed with BAP (0.1mM) or water (control) every 3 days for 20 days. Delay of leaf senescence in BAP treated plants was monitored by quantification of chlorophyll and totally soluble protein. Gas exchange was estimated by stomatal conductance (g_s) and CO_2 fixation rate. The water relationships were evaluated by the water potential (Ψ_A) and its components, osmotic (Ψ_s) and turgor potential (Ψ_t) every 5 days for 20 days. BAP treated leaves showed higher total concentration of chlorophyll and protein from day 26, in compari-

son with the control. The difference increased with time and 41 DAS they were 7 times higher than the control. The g_s values were not significantly different from the pre-senescent green state. These responses were associated with higher CO_2 fixation rates with concentrations near those in the pre-senescent green leaves ($6.2\mu\text{mol}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). The Ψ_A remained constant under BAP and Ψ_s was significantly lower than in the controls, favoring the retention of solutes in cytoplasm of leaves with delay of senescence. The Ψ_t of BAP leaves was significantly higher than the respective controls from 31 to 41 DAS. Therefore, cytokinin BAP promoted the maintenance of the CO_2 fixation rate and water relationships during the delay of leaf senescence.

INTERCÂMBIO DE GASES E RELAÇÕES HÍDRICAS DURANTE O ATRASO DA SENESCÊNCIA FOLIAR DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) POR CÍTOCININA BAP

Ricardo Martínez-Gutiérrez, Hilda Zavaleta-Mancera, Lucero Del Mar Ruíz-Posadas, Adriana Delgado-Alvarado e Rocío Vaca-Paulín

RESUMO

Estudou-se o efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) no intercâmbio de gases e relações hídricas de 1 L. durante o atraso da senescência foliar em invernadeiro. Plântulas de 21 dias depois de semeadas (DDS) foram borrifadas com BAP 0,1mM ou água (testemunho) cada 3 dias por 20 dias. O atraso de senescência foliar nas plantas tratadas com BAP foi monitorado mediante quantificação de clorofila e proteína solúvel total. O intercâmbio de gases se estimou mediante condutância estomática (g_s) e taxa de fixação de CO_2 . As relações hídricas se avaliaram medindo o potencial de água total (Ψ_A) e seus componentes, osmótico (Ψ_s) e de turgência (Ψ_t), cada 5 dias por 20 dias. As folhas tratadas mostraram maior concentração de clorofila e proteína total que o controle após 26 DDS, dife-

renças que aumentaram com o tempo e, aos 41 DDS foram 7 vezes maiores que o controle. A g_s registrou valores não significativamente diferentes ao estado verde pré-senescente. Estas respostas se associaram com taxas maiores de fixação de CO_2 , com concentrações próximas às das folhas verdes pré-senescentes ($6,2\mu\text{mol}\cdot\text{CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). O Ψ_A se manteve constante sob BAP e Ψ_s foi significativamente menor que nos testemunhos, favorecendo a retenção de solutos no citoplasma de folhas com atraso de senescência. O Ψ_t das folhas tratadas foi maior que seu respectivo testemunho de 31 a 41 DDS. Portanto, a citocinina BAP promoveu a manutenção da taxa de fixação de CO_2 e as relações hídricas durante o atraso da senescência foliar.

nutrientes, desarrollo floral y germinación de semillas, entre otros (Taiz y Zeiger, 1998; Schmölling *et al.*, 1997). Las citocininas también afectan directamente la síntesis y degradación de clorofila (Wingler *et al.*, 1998), proteína y ultraestructura de los cloroplastos (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999b), así como promueven y mantienen la apertura estomática (Tanaka *et al.*, 2006).

Es conocido el efecto de citocininas en el retraso de la senescencia foliar, retardando la pérdida de pigmentos y proteínas del cloroplasto (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003), promoviendo la acumulación de enzimas antioxidantes y reduciendo la concentración de H_2O_2 (Zavaleta-Mancera *et al.*,

2007). Durante el envejecimiento la hoja pierde agua, lo que promueve inhibición de la fotosíntesis e intercambio de gases, y se genera incapacidad de recuperar su estado hídrico inicial. Numerosos trabajos refieren el efecto positivo que tienen las citocininas en el intercambio de gases durante la senescencia. Por ejemplo, en *Nicotiana* y *Digitalis* la transpiración y apertura estomática se incrementó cuando fueron propagadas *in vitro* con un medio enriquecido de citocininas, siendo el efecto dependiente de la concentración (Dietrich *et al.*, 1992; Pospíšilová *et al.*, 2000)

Las citocininas antagonizan diversos procesos fisiológicos inducidos por la pérdida de

agua, principalmente aquellos que son mediados por el ABA. El ABA es un inhibidor de crecimiento que promueve la senescencia, mientras que las citocininas son consideradas como potentes inhibidores de ésta y actúan como antagonistas del ABA (Noodén y Leopold, 1988; Tanaka *et al.*, 2006). Durante éste proceso se promueve la acumulación de ABA y de etileno en hojas y otros órganos de la planta (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). La acumulación de ABA en las hojas de plantas expuestas a un continuo déficit hídrico afecta los movimientos estomáticos induciendo el cierre, reduciendo la tasa de transpiración, el transporte de solutos hacia las partes

aéreas de la planta y la tasa de asimilación de CO_2 , procesos que también ocurren de manera natural durante la senescencia (Kramer, 1989; Chandlee, 2001).

Sin embargo, el efecto positivo de las citocininas en la apertura estomática y transpiración no es consistente en todos los casos y varía dependiendo de la especie y la concentración. En algodón (*Gossypium hirsutum*), linaza (*Linum usitatissimum*), maíz (*Zea mays*) y remolacha (*Beta vulgaris*) las citocininas no afectan significativamente la apertura estomática, transpiración y tasa neta fotosintética (Radin *et al.*, 1982; Drüge y Schönbeck, 1992; Pospíšilová *et al.*, 2001). Estos autores

concluyeron que el efecto de las citocininas en el intercambio gaseoso no es general y depende frecuentemente de la especie y concentración sin haber diferencias significativas entre métodos de aplicación (asperjado y solución nutritiva).

La función de las citocininas en la regulación del estado hídrico de la planta es poco conocido y aún menos estudiado durante la senescencia (Cowan *et al.*, 2005), por lo que el objetivo trazado en este trabajo fue analizar el efecto de la citocinina 6-bencilaminopurina (BAP) en el intercambio de gases y relaciones hídricas durante el retraso de la senescencia foliar de *T. aestivum*.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Un promedio de 60 semillas de trigo (*Triticum aestivum* var. Temporalera) se sembraron en charolas de plástico de 33x28x13cm conteniendo una mezcla de *peat moss* y agrolita (95/5 v/v). Las charolas se colocaron en un diseño completamente al azar, con tres repeticiones para cada experimento en un invernadero del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, a 19°29'N y 98°54'O y 2250msnm (García, 1988) con temperaturas máxima y mínima promedio de 30 ±2°C y 8 ±4°C. Las charolas se regaron con agua corriente cada tercer día durante todo el experimento. Tras 20-21 días después de la siembra (DDS) las plántulas presentaron la segunda hoja, la que se utilizó para realizar las evaluaciones.

Tratamientos

Plántulas de 20-21DDS que mostraron la segunda hoja expuesta, se asperjaron (5ml) con una solución de 0,1mM de 6-bencilaminopurina (BAP; Sigma) con 0,02% dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma) y 0,02% Tween 20 (Boehringer Mannheim GmbH). Las plántulas testigo se asperjaron

con una solución preparada de la misma forma que la solución de BAP pero sin el fitoregulator. Las aspersiones se realizaron a las 9:00 horas cada tercer día durante 20 días, para un total de 7 aspersiones. El retraso de la senescencia foliar de la segunda hoja asperjada con BAP fue monitoreada mediante la cuantificación de clorofila y proteína soluble total.

Cuantificación de clorofila

Fragmentos de 3cm de la parte media de la segunda hoja fueron macerados en 4ml de acetona 80% a 4°C. El extracto se centrifugó a 840g por 10min. El sobrenadante fue recuperado y ajustado a 4ml; la concentración de clorofila total (Chl) se cuantificó de acuerdo a Lichtenthaler y Wellburn (1983) se expresó en mgChl·gPF⁻¹.

Cuantificación de proteína soluble

Muestras de 150mg de tejido fresco de la parte media de la segunda hoja fueron congeladas en N₂ líquido y maceradas con 1ml de amortiguador de fosfatos 50mM pH 7,5 con 1mM DTT; 0,1 mM EDTA y 12,5% glicerol. El extracto se centrifugó a 15000g a 4°C por 10min. Se usaron 5µl del sobrenadante para la determinación de proteínas de acuerdo al método de Bradford (1976).

Intercambio de gases

Las mediciones de intercambio de gases se realizaron *in situ* con un sistema abierto y portátil de análisis de gases en el espectro infrarrojo (CIRAS-1, PP Systems, Inglaterra) en la sección central de la segunda hoja con lígula expuesta. La cámara de intercambio de gases se mantuvo a una temperatura de 29 ±2°C, irradianza de 320µmol·m⁻²·s⁻¹, humedad relativa del 52% y concentración de CO₂ de referencia de 390µmol·mol⁻¹. Las mediciones se hicieron en 10 individuos por trata-

miento cada cinco días por un periodo de 20 días. La conductancia estomática (g_s) se registró en mmol·m⁻²·s⁻¹ y la tasa de fijación de CO₂ (A) en µmol·m⁻²·s⁻¹.

Relaciones hídricas

Las mediciones de potencial de agua total (Ψ_A) se hicieron con una bomba de presión tipo Scholander (Scholander *et al.*, 1965). La lámina se introdujo dentro de la cámara, dejando la parte basal expuesta. La presión interior de la cámara se incrementó hasta obtener un balance de presión en la columna de agua del xilema en la hoja, el cual se alcanzó cuando una pequeña gota de savia apareció en la zona expuesta (Turner, 1988). El potencial osmótico (Ψ_s) se determinó en un fragmento de la misma hoja que se usó para el Ψ_A; el cual fue envuelto en papel aluminio, introducido en N₂ líquido y macerado en un tubo ependorff para extraer el contenido celular. Se tomó una alícuota de 10µl del material extraído, la cual se adicionó a discos de papel filtro donde se midió el Ψ_s con un osmómetro de presión de vapor previamente calibrado (Vapro/Wescor 5520). El potencial de turgencia se calculó como la diferencia entre el Ψ_A y el Ψ_s.

Análisis estadístico

La significancia estadística de las diferencias entre los tratamientos se determinó mediante la prueba de t-student con un nivel de significancia del 5%; también se reali-

zaron correlaciones simples. El paquete estadístico utilizado fue Statgraphics Plus 4.

Resultados

La concentración de clorofila (Chl) y la proteína soluble total fueron cuantificadas con el objetivo de monitorear el estado de senescencia de las hojas en el tiempo. La concentración de Chl en hojas asperjadas con 0,1mM BAP fue significativamente mayor que aquella registrada para el tratamiento testigo (Figura 1a). Esta diferencia se observó y se mantuvo a partir de los 26 DDS, con valores de 91, 73, 73 y 57% en relación a la concentración Chl inicial, a los 26, 31, 36 y 41 DDS, respectivamente. En contraste, la concentración de Chl en el tratamiento testigo disminuyó drásticamente en el mismo

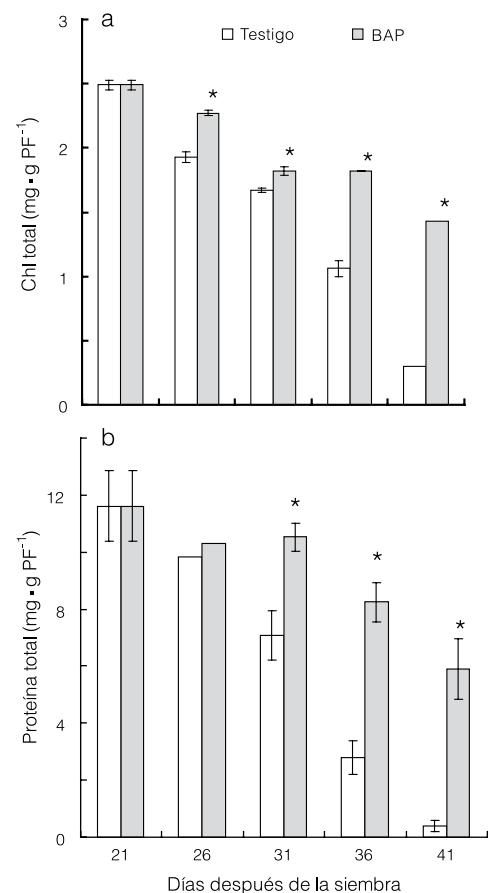


Figura 1. Concentración de clorofila total (a) y de proteína soluble total (b) durante la senescencia de la segunda hoja de *T. aestivum* (testigo) y su retraso por efecto de 0,1mM BAP. Los datos son promedios ±ES; n= 8. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre tratamientos (P<0,05).

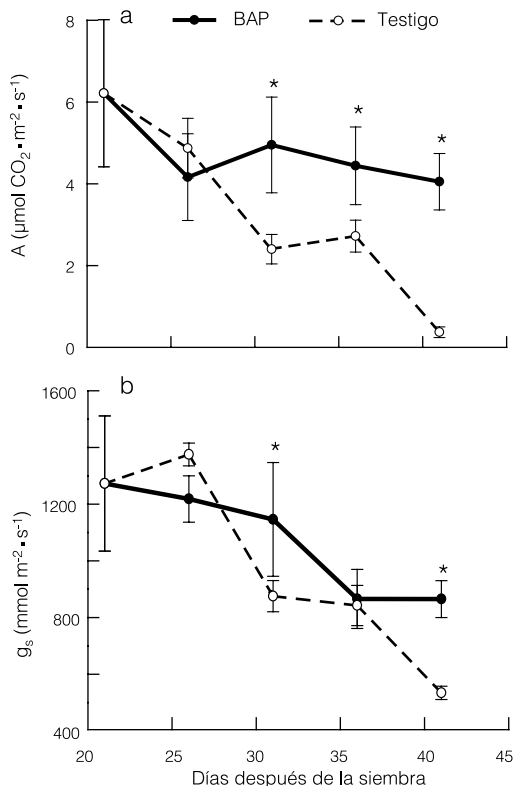


Figura 2. Tasa de asimilación de CO₂ (a) y conductancia estomática (b) durante la senescencia de la segunda hoja de *T. aestivum* (testigo) y su retraso por efecto de 0,1mM BAP. Los datos son promedios ±ES; n= 8. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre tratamientos (P<0,05).

tiempo, con valores de 77, 67, 42 y 12% en relación a la concentración inicial.

La concentración de proteína soluble total también disminuyó con el tiempo en ambos tratamientos, pero en forma más pronunciada en el tratamiento testigo (Figura 1b). A los 26 DDS no se observó diferencia significativa entre tratamientos; sin embargo, para el día 31 DDS la diferencia entre tratamientos fue muy evidente. Para ese momento la concentración de proteína soluble en las hojas tratadas con BAP no presentó cambio significativo en relación con la concentración inicial, mientras que en las hojas del tratamiento testigo la proteína se degradó significativamente (P<0,05) en un 39% con respecto a la concentración inicial (21 DDS). A los 36 DDS la proteína en las hojas del tratamiento testigo se degradó en 76%; en contraste, la concentración de proteína en las hojas tratadas con BAP

se redujo solo 29%. El efecto más pronunciado y significativo se observó a los 41 DDS, cuando las hojas tratadas con BAP conservaron 50% de su proteína soluble total inicial mientras que las hojas del tratamiento testigo únicamente conservaron el 4%.

La concentración de clorofila total y la cantidad de proteína soluble total de la segunda hoja se correlacionaron positivamente; para las plantas tratadas con BAP el valor de r² (P<0,05) fue del 92% mientras que para las plantas no tratadas fue de 99%.

La tasa de asimilación de CO₂ (A) en las hojas tratadas con BAP se mantuvo sin cambios significativos durante el experimento, mientras

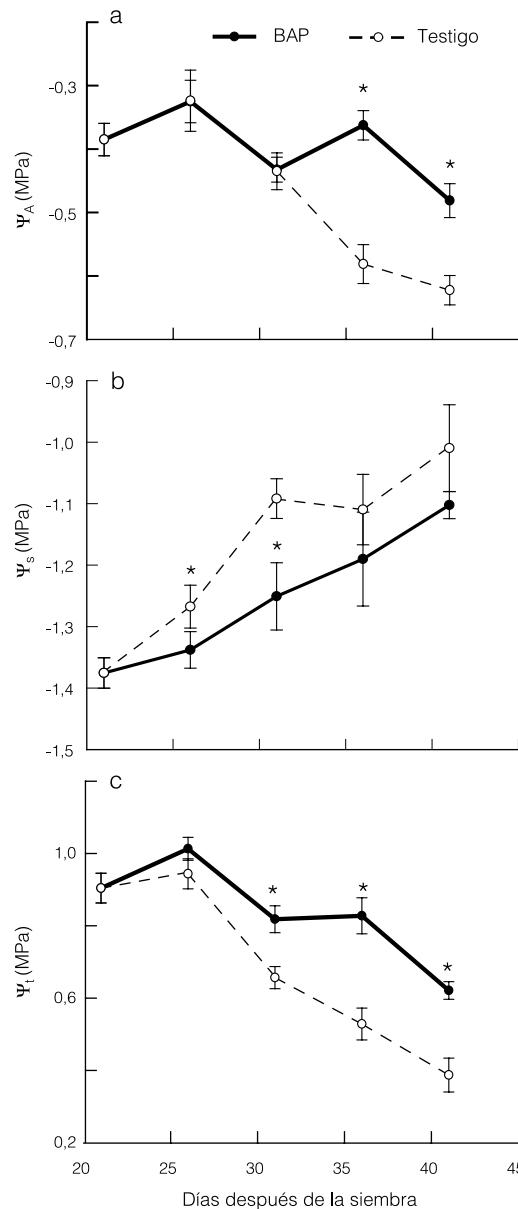


Figura 3. Relaciones hídricas durante la senescencia de la segunda hoja de *T. aestivum* (testigo) y su retraso por efecto de 0,1mM BAP. a: potencial de agua (Ψ_A), b: potencial osmótico (Ψ_s) y c: potencial de turgencia (Ψ_t). Los datos son promedios ±ES; n= 8. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre tratamientos (P<0,05).

que en las hojas testigo, la A se redujo significativamente, encontrándose diferencias significativas a los 31, 36 y 41 DDS entre los dos tratamientos (Figura 2a). Estos resultados indican que el BAP mantuvo funcionando la maquinaria fotosintética, con valores promedio de 4µmol CO₂·m⁻²·s⁻¹, cercanos a los observados en las hojas verdes pre-senescentes (6,2µmol CO₂·m⁻²·s⁻¹). Las plantas testigo redujeron la A en 61,3%,

56,2% y 94% a los 31, 36 y 41 DDS, respectivamente, mientras que, en contraste, a los 41 DDS las hojas tratadas con BAP presentaron un promedio mayor que el testigo y similares al estadio inicial (Figura 2a).

Con respecto a la g_s, los resultados se comportaron de manera similar a los obtenidos en la A. Ambas variables están estrechamente relacionadas; a mayor conductancia estomática, mayor será la A. La g_s (Figura 2b) se mantuvo en 68% (864,9mmol·m⁻²·s⁻¹) en las hojas tratadas con BAP a los 41 DDS, mientras que en hojas testigo se redujo significativamente a 41% (534mmol·m⁻²·s⁻¹) respecto al valor inicial (1272mmol·m⁻²·s⁻¹).

Durante la senescencia (21-41 DDS) las hojas del tratamiento testigo disminuyeron gradualmente su Ψ_A (Figura 3a) hasta alcanzar un valor de -0,62MPa a los 41 DDS; en contraste, el Ψ_A de las hojas tratadas con BAP no cambió significativamente del día 21 DDS (verde pre-senescente) manteniéndose en un promedio de -0,45MPa. Las plantas tratadas con BAP mantuvieron en general un Ψ_s (Figura 3b) menor que las plantas testigo, sin embargo solamente en los días 26 y 31 DDS se observaron diferencias estadísticamente significativas. El Ψ_t (Figura 3c) disminuyó gradualmente en el tiempo en ambos tratamientos, pero los valores fueron significativamente mayores en las hojas tratadas con BAP (P<0,05). En 31 a 36 DDS las hojas tratadas con BAP mantuvieron su Ψ_t a 0,82MPa sin cambios significativos (P<0,05); en contraste, las hojas del tratamiento testigo redujeron su Ψ_t significativamente a 0,52MPa. A los 41 DDS el Ψ_t en las hojas del tratamiento testigo se redujo a 0,38MPa, en contraste con las hojas con BAP que presentaron valores de Ψ_t de 0,61MPa, significativamente mayores que el testigo (P<0,05).

Discusión

El retraso de la senescencia foliar de trigo por efecto de aplicaciones de BAP, evidenciado por concentraciones altas de Chl y proteína soluble total, estuvo asociado con tasas altas de A, Ψ_A , Ψ_s y Ψ_t . Se observó que la concentración de Chl total y proteína soluble en hojas del tratamiento testigo disminuyeron significativamente a los 41 DDS, en contraste con las hojas asperjadas con BAP, que conservaron concentraciones altas de Chl y proteína.

Entre los muchos procesos bioquímicos que modulan las citocininas en plantas está la inhibición de la actividad de clorofilasas y proteasas durante el retraso de la senescencia (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). El hecho que la aplicación de BAP mantuviera concentraciones altas de proteínas en *T. aestivum*, comparados con las hojas del tratamiento testigo, se puede asociar a los valores altos de Ψ_A . En condiciones de Ψ_A alto hay modulación de la síntesis de proteínas como la sucrosa-fosfato-sintasa, mientras que en condiciones de Ψ_A bajo su síntesis es inhibida debido a una acumulación de iones que desestabiliza la molécula dimérica (Huber y Huber, 1996). Cuando el Ψ_A es bajo, se incrementa la pérdida de polisomas y se promueve una desestabilización de la estructura cuaternaria de las proteínas. La BAP y otras citocininas modulan la expresión de varias proteínas cloroplásticas, pueden promover la aparición de la protoclorofilide óxido reductasa (POR) responsable de la síntesis de clorofila (Zavaleta Mancera *et al.*, 1999a) y la acumulación de Rubisco, proteína esencial en la carboxilación (Ookawa *et al.*, 2004). En el presente estudio se encontró que la BAP (0,1mM) mantuvo los valores mas altos de Ψ_A , hasta en 80%, en contraste con las hojas del tratamiento testigo, en donde solo se mantuvo el 21% del valor inicial. Los valores de Ψ_A bajos de

las hojas senescentes de trigo (testigo), generados por una disminución en el contenido relativo de agua, se reflejaron en una reducción de la A y g_s , como lo sugirió Lawlor (2002) para plantas C3 y C4. Esta reducción en la A estuvo probablemente asociada a una disminución del transporte de electrones normalmente observada en hojas con Ψ_A bajo (Gay y Thomas, 1995).

Durante la senescencia se promueve el cierre de los estomas por la acumulación de ABA, fenómeno que ocurre de manera natural (Kramer, 1989; Wingler *et al.*, 2000; Dodd, 2003). Los estomas son sensibles a la aplicación de citocininas y su respuesta depende de la especie y edad de la hoja. De acuerdo con los resultados obtenidos, la BAP probablemente antagonizó el efecto del ABA en las hojas senescentes y mantuvo la apertura estomática en trigo, favoreciendo así un intercambio de gases eficiente en las hojas con retraso de senescencia. Datos similares fueron encontrados en *Arabidopsis* por Tanaka *et al.* (2006), quienes demostraron que la citocinina benciladenina y la auxina ácido naftalenoacético, inhibieron el cierre estomático promoviendo el intercambio de gases. La sobreproducción de citocininas en plantas transformadas de *Petunia* inhibió el efecto del ABA y retrasó la senescencia de flores, además de disminuir la sensibilidad al etileno (Chang *et al.*, 2003). Los mecanismos por los cuales la BAP promueve la apertura estomática podrían involucrar una estimulación directa de la membrana a través de una hiperpolarización, resultado de una translocación de H^+ ; proceso que activa la adenilato-ciclasa e induce un incremento en el contenido intracelular del adenosin 3,5 monofosfato cíclico, que a su vez interactúa con el sistema calcio-calmodulina y con la regulación de canales permeables al ABA, favoreciendo la apertura estomática (Incoll *et al.*, 1990; Pharmawati *et al.*,

1998). El Ψ_A bajo encontrado en las hojas senescentes del tratamiento testigo se correlacionó ($r= 81$; $P<0,05$) con la pérdida de proteína soluble total y una disminución en la A y g_s . Es probable que el Ψ_A bajo haya afectado algún factor de acoplamiento y al ATP en el cloroplasto, como lo sugirieron Tezara *et al.* (1999). En este estudio, la disminución de la A no se asoció con los bajos valores de Ψ_A registrados ($P>0,05$), pero si se correlacionó (datos no mostrados) con la concentración relativa baja de la proteína LSU de Rubisco ($P<0,05$) cuantificada a los 41 DDS en hojas senescentes (tratamiento testigo). Estos resultados coinciden con los encontrados en plantas de tabaco en donde valores de Ψ_A bajos redujeron la concentración y actividad de Rubisco, así como la síntesis de nuevas proteínas (Lawlor, 2002; Parry *et al.*, 2002), promoviendo un incremento de iones Mg^{2+} dentro del cloroplasto y una disminución en la síntesis de Rubisco y Rubisco-carboxilasa necesarias para la asimilación del CO_2 (Lawlor, 2002).

El Ψ_s aumenta durante la senescencia de las plantas en ambos tratamientos, aunque en menor grado en las hojas tratadas con BAP (Figura 3b), respuesta que contrasta con las observaciones reportadas en plantas de soya (Zur *et al.*, 1981). En las hojas tratadas con BAP se mantuvieron los valores del Ψ_s por debajo de los de las hojas testigo, lo que indica una mayor concentración de solutos en el citoplasma. Es probable que la síntesis de nuevas proteínas promovida por BAP (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003) aumentara el contenido de solutos intracelulares, manteniendo la turgencia de las células reflejada por el Ψ_A en las hojas con retraso de senescencia o, alternativamente, que la aplicación de la BAP haya permitido mantener mayor tiempo la integridad del plasmalema y de esta forma evitar la salida de iones

por efecto de la senescencia. El efecto de la BAP en la reducción de la pérdida de electrolitos fue demostrada en hojas de trigo incubadas en la oscuridad (Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007). Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transformadas con el gen *ipt* y sometidas a estrés con sales presentaron concentraciones altas de citocininas que promovieron la acumulación de prolina, otros aminoácidos y azúcares solubles, confirmando tolerancia a las plantas transformadas (Thomas *et al.*, 1995). Mecanismos similares pudieran estar regulando la concentración de solutos en las hojas con retraso de senescencia.

Con respecto al Ψ_t , las hojas tratadas con BAP mantuvieron valores significativamente mayores que las hojas del tratamiento testigo entre 31 y 41 DDS, periodo en el que el testigo redujo su Ψ_t hasta en 68%. Un estudio previo en trigo demostró que la BAP redujo la pérdida de iones, evidencia indirecta de la integridad de membranas (Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007). Se propone que la BAP mantuvo la integridad de la membrana a través de un efecto protector contra la degradación de proteínas integrales que mantienen la permeabilidad y ayudan a mantener la turgencia de la célula. Existen pocos estudios sobre el efecto de las citocininas en el intercambio de gases y relaciones hídricas durante la senescencia, y la mayoría de los trabajos se enfocan al estudio del efecto de las citocininas en la rehidratación después de un estrés hídrico (Rulcová y Pospíšilová, 2001). Las citocininas promueven un aumento en el Ψ_A , favoreciendo la rápida recuperación del contenido relativo de agua en la planta, pero aún no se conocen los mecanismos de acción de estos procesos (Rulcová y Pospíšilová, 2001), por lo que se sugiere llevar a cabo estudios sobre la interacción del ABA y BAP en las relaciones hídricas e intercambio de

gases durante la senescencia y su retraso. En el presente trabajo no se observaron valores de Ψ_A (-0,6MPa) que indicaran estrés hídrico, pero la citocinina mantuvo la turgencia de las células en contraste con el testigo.

Conclusiones

La citocinina 6-bencilaminopurina (BAP), al retrasar la senescencia foliar en *T aestivum*, evitó la degradación de clorofila y proteína soluble total, y mantuvo valores significativamente más altos de los potenciales de agua total, osmótico y de turgor en comparación con el tratamiento testigo, valores que fueron similares al estado inicial (pre-senescente). Se mantuvo la actividad fotosintética de la hoja. La BAP mantuvo la apertura de los estomas y como consecuencia la conductancia estomática, efecto que se reflejó también en el mantenimiento de la tasa de fijación de CO₂.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la revisión del manuscrito y sugerencias de Carlos Trejo López. Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (Proyecto SEP-CO-NACYT 43866/A-1).

REFERENCIAS

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* 72: 248-254.
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D (2003) The molecular analysis of plant senescence a genomics approach. *Plant Biotechnol. J.* 1: 3-22.
- Chandless JM (2001) Current molecular understanding of the genetically programmed process of leaf senescence. *Physiol. Plant.* 113: 1-8.
- Chang H, Jones LM, Banowitz MG, Clark GD (2003) Overproduction of cytokinins in petunia flowers transformed with P_{SAG12}-IPT delays corolla senescence and decreases sensitivity to ethylene. *Plant Physiol.* 132: 2174-2183.
- Cowan AK, Freeman M, Björkman PO, Nicander B, Sitbon F, Tillberg E (2005) Effects of senescence-induced alteration in cytokinin metabolism on source-sink relationships and ontogenic and stress-induced transitions in tobacco. *Planta* 221: 801-814.
- Dietrich B, Mertinat H, Luckner M (1992) Reduction of water loss during *ex vitro* acclimatization of micropropagated *Digitalis lanata* clone plants. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 188: 23-31.
- Dodd CI (2003) Hormonal interactions and stomatal responses. *J. Plant Growth Regul.* 22: 32-46.
- Drüge U, Schönbeck F (1992) Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on transpiration, photosynthesis and growth of flax (*Linum usitatissimum* L.) in relation to cytokinin levels. *J. Plant Physiol.* 141: 40-48
- García E (1988) *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen, para Adaptarlo a las Condiciones de la República Mexicana*. 4ª ed. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 246 pp.
- Gay AP, Thomas H (1995) Leaf development in *Lolium temulentum*: photosynthesis in relation to growth and senescence. *New Phytol.* 130: 159-168.
- Huber SC, Huber JL (1996) Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 851-859.
- Incoll LD, Ray JP, Jewer PC (1990) Do cytokinins act as root to shoot signals? En Davies WJ, Jeffcoat B (Eds.) *Importance of Root to Shoot Communication in the Responses to Environmental Stress*. British Society for Plant Growth Regulation. Bristol, RU. pp. 185-196.
- Kramer PJ (1989) *Water relations of plants*. Academic Press. Londres, RU. 489 pp.
- Lawlor WD (2002) Limitations to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs metabolism and the role of ATP. *Ann. Bot.* 89: 871-885.
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11: 591-592.
- Noodén LD, Leopold ZC (1988) The phenomena of senescence and aging. En *Senescence and aging in plants*. Academic Press. San Diego, CA, EEUU. pp. 1-50.
- Ookawa T, Naruoka Y, Samaya A, Hirasawa T (2004) Cytokinin effects on Ribulose-1,5-Biphosphate carboxylase/oxygenase and nitrogen partitioning in rice during ripening. *Crop Sci.* 44: 2107-2115.
- Parry MAJ, Andraloje PJ, Khan S, Lea PJ, Keys AJ (2002) Rubisco activity: effects of drought stress. *Ann. Bot.* 89: 833-839.
- Pharmawati M, Billington T, Gehring CA (1998) Stomatal guard cell responses to kinefin and natriuretic peptides are cGMP-dependent. *Cell Mol. Life Sci.* 54: 272-276.
- Pic E, de la Serve BT, Tardieu F, Turc O (2002) Leaf senescence induced by mild water-deficit follows the same sequence of macroscopic, biochemical, and molecular events as monocarpic senescence in pea. *Plant Physiol.* 128: 236-246.
- Pospíšilová J, Synková H, Rulcová J (2000) Cytokinins and water stress. *Biol. Plant.* 43: 321-328.
- Pospíšilová J, Rulcová J, Voměčka L (2001) Effect of benzyladenine and hydroxybenzyladenosine on gas exchange of bean and sugar beet leaves. *Biol. Plant.* 44: 523-528.
- Radin JW, Parker LL, Guinn G (1982) Water relation of cotton plants under nitrogen deficiency. V. Environmental control and abscisic acid accumulation and stomata sensitivity to abscisic acid. *Plant Physiol.* 70: 1066-1070.
- Rulcová J, Pospíšilová J (2001) Effect of benzylaminopurine on rehydration of bean plants after water stress. *Biol. Plant.* 44: 75-81.
- Schmülling T, Schäfer S, Romanov G (1997) Cytokinins as regulators of gene expression. *Physiol. Plantarum* 100: 505-519.
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339-346.
- Taiz L, Zeiger E (1998) *Plant Physiology*. 2a ed. Sinauer. Sunderland, MA, EEUU. 792 pp.
- Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, Nakajima N, Kondo N, Hasezawa S (2006) Cytokinin and auxin inhibit abscisic acid-induced stomatal closure by enhancing ethylene production in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 57: 2259-2266.
- Tezara W, Mitchell VJ, Driscoll SD, Lawlor DW (1999) Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* 401: 914-917.
- Thomas JC, Smigocki AC, Bohner HJ (1995) Light-induced expression of *ipt* from *Agrobacterium tumefaciens* results in cytokinin accumulation and osmotic stress symptoms in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 27: 225-235.
- Turner NC (1988) Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. *Irrig. Sci.* 9: 289-308.
- Wingler A, von Schaewen A, Leegood RC, Lea PJ, Quick WP (1998) Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars and light. Effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Planta* 116: 329-335.
- Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC (2000) Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond.* 355: 1517-1529.
- Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q, Liu L (2002) Abscisic acid and cytokinins in the root exudates and leaves and their relationship to senescence and remobilization of carbon reserves in rice subjected to water stress during grain filling. *Planta* 215: 645-652.
- Zavaleta-Mancera HA, Franklin KA, Ougham HJ, Thomas H, Scott IM (1999a) Regreening of senescent *Nicotiana* leaves I. Reappearance of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase and light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein. *J. Exp. Bot.* 50: 1677-1682.
- Zavaleta-Mancera HA, Thomas BJ, Thomas H, Scott IM (1999b) Regreening of senescent *Nicotiana* leaves II. Redifferentiation of plastids. *J. Exp. Bot.* 50: 1683-1689.
- Zavaleta-Mancera HA, López-Delgado H, Loza-Tavera, Mora-Herrera M, Trevilla-García C, Vargas-Suárez M, Ougham H (2007) Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *J. Plant Physiol.* 164: 1572-1582.
- Zur B, Boote KJ, Jones JW (1981) Changes in internal water relations and osmotic properties of leaves in maturing soybean plants. *J. Exp. Bot.* 32: 1181-1191.