

# **COLEGIO DE POSTGRUADOS**

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN  
CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE BOTÁNICA**

**LA CITOCININA BAP EN EL METABOLISMO PRIMARIO DE HOJAS**

**SENESCENTES DE TRIGO**

**ROSALINDA GONZÁLEZ SANTOS**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2008

La presente tesis, titulada: **La citocinina BAP en el metabolismo primario de hojas senescentes de trigo**, realizada por el alumno: Rosalinda González Santos, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



---

Dra. Adriana Delgado Alvarado

ASESOR



---

Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera

ASESOR



---

Dr. B. Edgar Herrera Cabrera

Montecillo, Texcoco, Estado de México, mayo de 2008

## LA CITOCININA BAP EN EL METABOLISMO PRIMARIO DE HOJAS

### SENESCENTES DE TRIGO

Rosalinda González Santos, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2008

La senescencia foliar es la última fase de desarrollo de las hojas, se caracteriza por una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos. El principal propósito de éste proceso es la traslocación de nutrientes especialmente el nitrógeno. Las principales biomoléculas del metabolismo primario se degradan como: los pigmentos fotosintéticos, proteínas y enzimas fotosintéticas. Sin embargo, la aspersión externa de la citocinina BAP y la sobre-expresión de isopentenil fosfotransferasa en las hojas retrasa el catabólismo de estos compuestos y mantiene la actividad fotosintética. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la aplicación externa de la citocinina 6-bencilaminopurina (BAP) en el metabolismo primario, durante la senescencia natural de la segunda hoja laminar de *Triticum aestivum* L cv. Temporalera, mediante la determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos, proteínas solubles, aminoácidos, Rubisco, carbohidratos, actividad enzimática de fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) y de fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), y la integridad de la membrana. Las hojas asperjadas con BAP conservaron 40% de su clorofila total, mientras que el testigo presentó 8% en el día 41 después de la siembra. En relación con las proteínas solubles, las hojas tratadas con el regulador de crecimiento mantuvieron 30%, mientras que el testigo sólo 1.90% en esta fecha. BAP indujo una mayor acumulación de hexosas y actividad enzimática de PEPC y PEPCK. Además, la integridad de la membrana no se alteró, en comparación con el testigo. En conclusión, los datos muestran que la aplicación externa de BAP tuvo importantes efectos en el metabolismo primario: retrasó la degradación de pigmentos fotosintéticos y proteínas solubles. Se conservó una mayor abundancia de Rubisco y originó una mayor acumulación de carbohidratos respecto al testigo. La actividad enzimática de PEPCK y PEPC fue mayor en el testigo que en el tratamiento con la citocinina, particularmente la máxima actividad de PEPC coincidió con los contenidos mayores de aminoácidos, lo que sugiere que la enzima puede estar relacionada con la regulación del pH. Todos estos cambios permitieron conservar significativamente la integridad celular.

**Palabras clave:** azúcares solubles, fosfoenolpiruvato carboxicinasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, *Triticum aestivum* L.

# THE CYTOKININ BAP IN THE PRIMARY METABOLISM OF SENESCENT WHEAT LEAVES

Rosalinda González Santos, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2008

The leaf senescence is the final phase of leaf development, is characterized by a series of physiological and biochemical changes. The main purpose of this process is the translocation of nutrients mainly nitrogen. The main biomolecules of metabolism primary are degraded such as photosynthetic pigments, proteins and photosynthetic enzymes. However, the spray application of the 6-bencilaminopurina (BAP) cytokinin and the overexpression of isopentenyl phosphotransferase in the leaves delay catabolism of these compounds and maintain the photosynthetic activity. The objective of the present work was to study the effect of the spray application of BAP in the primary metabolism during natural senescence of the second leave of *Triticum aestivum* L cv. Temporalera by assaying the content of photosynthetic pigments, soluble proteins, amino acids, Rubisco, carbohydrates, enzymatic activity of phosphoenolpyruvate carboxikinasesa (PEPCK) and phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), and the integrity of the membrane. The leaves sprayed with BAP retained 40% of its total chlorophyll, while the control only showed 8% at 41 days after planting. Regarding to the soluble proteins, leaves treated with the growth regulator kept 30%, whereas the control only 1.90% at this date. BAP induced significantly a greater accumulation of hexoses and enzymatic activity of PEPC and PEPCK. In addition, the integrity of the membrane did not change respect to the control. In conclusion, the data show that the spray application of BAP had important effects in the primary metabolism: delayed the photosynthetic pigment degradation and soluble proteins. It was retained a greater abundance of Rubisco and was made a greater accumulation of carbohydrates than the control. The enzymatic activity of PEPCK and PEPC was higher than the control, particularly the maximum PEPC activity coincided with the higher contents of amino acids, which suggest that the enzyme could be related with the pH regulation. All these changes allowed keeping significantly the cell integrity.

**Keywords:** soluble sugars, phosphoenolpyruvate carboxykinase, phosphoenolpyruvate carboxylase, *Triticum aestivum* L

## AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada para la realización de mis estudios de postgrado.

Al proyecto **SEP-CONACyT No. 43866-Z** por el apoyo económico para realizar la investigación del presente trabajo.

También en la elaboración de este trabajo me han ayudado muchas personas con las que me siento en deuda, en mayor o menor medida, con todos ellos sin excepción.

En primer lugar quisiera agradecer a mi directora de tesis, la **Dra. Adriana Delgado Alvarado**, su labor constante en la dirección de este trabajo, el haber confiado en mí desde un principio, su paciencia, su crítica y su enorme calidad científica; todo ello ha hecho posible mi iniciación en este mundo de búsqueda de la razón.

A la **Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera**, la persona con mayor capacidad de trabajo y esfuerzo que conoceré jamás, gracias por su asesoría, acertados comentarios y paciencia en la elaboración y escritura de la tesis.

Al **Dr. Edgar Herrera Cabrera** por su valiosa colaboración y disponibilidad durante el desarrollo de la investigación y sus importantes aportaciones para enriquecer el trabajo.

Al **Dr. Héctor E. Villaseñor Mir** del Programa de Trigo de Temporal, Campo Experimental Valle de México, INIFAP por su amabilidad en donarnos la semilla de trigo variedad Temporalera utilizada para los diferentes experimentos de este trabajo.

A **Ricardo Martínez, Coyol Figueroa y Vicente Zamora** por la ayuda desinteresada brindada que hicieron posible que esta tesis se concluyera.

## DEDICATORIA

A **Dios** por permitirme realizar mis metas y darme la sabiduría para lograr cada objetivo planteado a realizar, gracias por permitirme seguir adelante.

Con cariño, respeto y admiración a mi **mamá, Eva Santos**, que es la persona que más amo en el mundo, mi inspiración y motivo para seguir adelante.

A mis hermanos **Pera, Abel, Flor y Jaime**, por su cariño, apoyo y sus palabras de aliento, los quiero mucho. En especial a mi sobrinita **Florecita** estoy segura que vienes alegrarnos la vida.

A mi **papá, Abel González**, gracias por haberme dado la vida y por mostrarme las cosas que no se deben de hacer en esta vida.

A **Rafael Nieto** por su compañía, cariño y los momentos padres que hemos pasado juntos.

A mis amigos con los cuales he compartido alegrías y tristezas durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados. De los cuales he aprendido y me han hecho crecer como persona: **Isabel Garcia, Janet Vidal de la Paz, Rosalba Argumedo, Coyol Figueroa, Ameyali, Rafael Nieto, Antonio Trevilla, Miguel Mata, Ricardo Martínez, Luis Zárate, Víctor, Juan Zaragoza, Agustín Hernández y Remedios Zamora.**

---

Índice	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	3
2.1. Senescencia foliar	3
2.1.1 Catabolismo de pigmentos fotosintéticos	5
2.1.1.1 Clorofilas	5
2.1.1.2 Carotenoides y xantofilas	6
2.1.2 Degradación de proteínas	7
2.1.2.1 Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa	8
2.1.3 Azúcares	9
2.1.3.1 Función de los azúcares durante la senescencia foliar	10
2.1.4 Almidón	12
2.1.5 Degradación de lípidos	13
2.1.6 Translocación de nutrientes	14
2.1.7 Fosfoenolpiruvato carboxicinaasa (PEPCK)	15
2.1.7.1 Propiedades de PEPCK	16
2.1.7.2. Funciones de PEPCK	18
2.1.8 Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)	19
2.1.8.1 Propiedades de PEPC	21
2.1.8.2 Funciones de PEPC	23
2.1.9 PEPCK y PEPC durante la senescencia	23
2.2 Citocininas	24
2.2.1 Estructura y biosíntesis	24
2.2.2 Función de las citocinina	26
2.2.3 Transducción de señales de las citocininas	27
2.2.4 Las citocininas y el retraso de la senescencia	28
<b>3. OBJETIVOS</b>	32
3.1 Objetivo general	32
3.2 Objetivos específicos	32
<b>4. HIPÓTESIS</b>	33
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	34

---

5.1 Material biológico	34
5.2 Tratamiento y muestreo foliar	34
5.3 Cuantificación de pigmentos fotosintéticos	35
5.3.1 Unidades SPAD	35
5.3.2 Cuantificación química de pigmentos	35
5.4 Determinación de proteínas solubles totales	36
5.5 Contenido de la subunidad grande de Rubisco (LSU)	37
5.6 Aminoácidos totales	38
5.7 Azúcares solubles y almidón	39
5.8 Actividad enzimática de fosfoenolpiruvato carboxinasa (PEPCK)	42
5.9 Actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)	43
5.10 Medición de la pérdida de electrolitos	44
5.11 Diseño experimental	45
5.12 Análisis estadístico	46
<b>6. RESULTADOS</b>	47
6.1 Unidades SPAD	47
6.2 Degradación de clorofila total, proteínas solubles totales y hexosas durante la senescencia natural	49
6.3 Pigmentos fotosintéticos	51
6.4 Aminoácidos totales	54
6.5. Subunidad grande (LSU) de Rubisco	55
6.6 Azúcares solubles	57
6.7 Almidón	59
6.8 Actividad de fosfoenolpiruvato carboxinasa (PEPCK)	60
6.9 Actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)	61
6.10 Medición de la pérdida de electrolitos	62
<b>7. DISCUSIÓN</b>	64
<b>8. CONCLUSIONES</b>	81
<b>9. LITERATURA CITADA</b>	83
<b>10. ANEXOS</b>	98



<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>		<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b>	Contenido de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> y xantofilas+carotenoides durante la senescencia natural de la segunda hoja de trigo, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua)	52
<b>Cuadro 2.</b>	Razón clorofila <i>a</i> :clorofila <i>b</i> y clorofila total: xantofilas + carotenoides en la segunda hoja de trigo durante la senescencia natural, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua)	54
<b>Cuadro 1A.</b>	Prueba Bondad y ajuste ( $\chi^2$ ) y Bartlett de diferentes variables de la segunda hoja de trigo durante la senescencia natural, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua)	98
<b>Cuadro 2A.</b>	Prueba Bondad y ajuste ( $\chi^2$ ) y Bartlett de diferentes variables de la segunda hoja de trigo durante la senescencia natural, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua)	98
<b>Cuadro 3A.</b>	Cuadros medios del análisis de varianza (ANOVA) de las variables con distribución normal y varianzas homogéneas (clorofila total, proteínas, clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , aminoácidos, rubisco, glucosa, fructosa, sacarosa y membranas) de la segunda hoja de trigo durante la senescencia natural, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua)	99
<b>Cuadro 4A.</b>	Cuadros medios del análisis de varianza (ANOVA) de las variables con distribución normal y varianzas homogéneas (clorofila total, proteínas, clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , aminoácidos, rubisco, glucosa, fructosa, sacarosa y membranas) de la segunda hoja de trigo durante la senescencia natural, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua)	99
<b>Cuadro 5A.</b>	Prueba Bondad y ajuste ( $\chi^2$ ), prueba de Bartlett y Kruskal-Wallis de las variables que no presentaron una distribución normal y varianzas homogéneas: unidades SPAD, xantofilas + carotenoides, almidón, PEPC y PEPCK de la segunda hoja de trigo durante la senescencia natural, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua)	100

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>		<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b>	Tres fases de la senescencia foliar y su características fisiológicas. Las hojas de la parte inferior del esquema son senescentes, y las flechas dentro del esquema indican la dirección del transporte de nutrientes	4
<b>Figura 2.</b>	Principales vías del metabolismo de nitrógeno y carbono en las células del mesófilo de hojas jóvenes (A) y senescentes (B) de tabaco	14
<b>Figura 3.</b>	Reacciones catalizadas por PEPCK y PEPC y su regulación	17
<b>Figura 4.</b>	Funciones anapléroticas y catapléroticas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos	20
<b>Figura 5.</b>	Mecanismo de carboxilación de fosfoenolpiruvato (PEP) por la fosfoenolpiruvato carboxilasa en una reacción de tres pasos	21
<b>Figura 6.</b>	Modelo hipotético de la función del ORE12/AHK3 en el control de la senescencia foliar mediado por las citocininas	29
<b>Figura 7.</b>	Interacción de las citocininas, represión de los azúcares y luz en la regulación de la senescencia con la producción autorregulada del regulador de crecimiento ( $P_{SAG12}$ - IPT)	31
<b>Figura 8.</b>	Cambios fenotípicos de la segunda hoja de trigo de los 21 a los 41 días después de la siembra (DDS). El testigo asperjado con agua y el tratamiento con BAP (0.1 mM)	48
<b>Figura 9.</b>	Unidades SPAD de la segunda hoja foliar de trigo asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua), durante la senescencia foliar natural	49
<b>Figura 10.</b>	Contenido de clorofila total (A), proteínas solubles (B) y Hexosas (C) durante la senescencia natural de la segunda hoja de trigo, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua)	50
<b>Figura 11.</b>	Contenido de aminoácidos totales en la segunda hoja de trigo, asperjadas con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua)	55

---

<b>Figura 12.</b>	Contenido de la subunidad grande (LSU) de Rubisco. A) Perfil electroforético en gel de poliacrilamida de la segunda hoja de trigo tratada con BAP (B) y solución testigo (T). B) Cuantificación del contenido de LSU por análisis densitométrico (ODU mm <sup>-2</sup> )	56
<b>Figura 13.</b>	Contenido de hexosas: A) glucosa y B) fructosa durante la senescencia natural de la segunda hoja foliar de trigo asperjada con la citocinina BAP (0.1 mM) y la solución testigo (agua)	58
<b>Figura 14.</b>	Contenido de sacarosa durante la senescencia natural de la segunda hoja foliar de trigo asperjada con la citocinina BAP (0.1 mM) y la solución testigo (agua)	59
<b>Figura 15.</b>	Contenido de almidón durante la senescencia natural de la segunda hoja foliar de trigo asperjada con la citocinina BAP (0.1 mM) y la solución testigo (agua)	60
<b>Figura 16</b>	Actividad de fosfoenolpiruvato carboxicinasas (PEPCK), durante la senescencia foliar natural de la segunda hoja de trigo, asperjada con la citocinina BAP (0.1 mM) y la solución testigo (agua)	61
<b>Figura 17.</b>	Actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) durante la senescencia foliar natural de la segunda hoja de trigo, asperjada con la citocinina BAP (0.1 mM) y la solución testigo (agua)	62
<b>Figura 18.</b>	Porcentaje de la liberación de electrolitos en la segunda hoja foliar de trigo, durante 41 días después de la siembra. En plantas tratadas con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua)	63

## ABREVIATURAS

3-PGA	3 fosfogliceraldehído
ABA	Ácido abscísico
ADP	Adenosina difosfato
AHK3	Proteínas receptoras histidina cinasa 3
AMP	Adenina 5'-monofosfato
AMP	Adenina 5-monofosfato
ARR2	Regulador respuesta 2
ATP	Adenosina trifosfato
BA	Benciladenina
BAP	6-bencilaminopurina
BSA	Albúmina de suero bovino
C+x	Carotenoides+xantofilas
C3	Plantas cuyo primer producto estable de la fijación del CO <sub>2</sub> es el ácido 3-fosfoglicérico, de tres carbonos
C <sub>4</sub>	Plantas que fijan el CO <sub>2</sub> en ácido málico o aspártico, de cuatro carbonos
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Clorofila <i>b</i>
CKs	Citocininas
cnd41	Aspartil peptidasa 41
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -Zeatina
DDS	Días después de la siembra
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
DZ	Dihidrozeatina
EDTA	Ácido tetra-acético diamino etileno
F1-6 BP	Fructosa 16-bifosfato
F6P	Fructosa 6-fosfato
FCCs	Catabolitos fluorescentes de clorofila
G6P	Glucosa 6-fosfato
GDH	Glutamato dehidrogenasa
GSAAT	Glutámico semialdehído aminotrasferasa
GDH	Glutamato deshidrogenasa
gin2	Glucosa-insensible 2
GS1	Glutamina sintetasa 1
GS1	Glutamina sintetasa citosólica
GS2	Glutamina sintetasa 2
GTP	Guanina trifosfato
HCO <sub>3</sub>	Ácido carbónico
HDI	Agua desionizada
HK	Receptores histidina cinasas
HMBDP	Hydroximetilbutenil difosfato
HP	Proteínas fosfotrasferasas

HXK	Hexocinasa
INIFAP	Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
iP	$N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenil)-adenina
IPT	Isopentenil fosfotransferasa
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
LHCP IIs	Proteínas-clorofílicas cosechadoras de luz del PSII
LHCP	Proteínas clorofílicas cosechadoras de luz
LSU	Subunidad grande de Rubisco
MDH	Enzima malico dehidrogenasa
meto	Derivados metoxi
mT	<i>meta</i> -Topolina
NADH	Nicotinamina adenina dinucleótido reducido
NAD-ME	Subtipo fisiológico de plantas C <sub>4</sub> , cuya enzima decarboxiladora es la NAD-enzima málico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
NCCs	Catabolitos no-fluorescentes de clorofila
OAA	Oxalacetato
oT	<i>ortho</i> -Topolina
PaO	Feoforbide <i>a</i> oxigenasa
PEP	Fosfo <i>enol</i> piruvato
PEPC	Fosfo <i>enol</i> piruvato carboxilasa
PEPCK	Fosfo <i>enol</i> piruvato carboxicinasa
PF	Peso fresco
P <sub>i</sub>	Fósforo inorgánico
P <sub>SAG12</sub> -IPT	Plantas que expresan el gen bacterial isopentilfosfotrasferasa bajo control del promotor específico de la senescencia SAG 12
PSII	Fotosistema II
RCC	Catabólitos rojos de clorofila
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RR	Reguladores respuesta
Rubisco	Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa
SAG 12	Gen que codifica para proteasas cisteínas
SAGs	Genes asociados a la senescencia.
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SGR	Gen siempre verde
SSU	Subunidades pequeña de Rubisco
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbónicos
TEMED	N,N,N,N'-Tetrametilenediamina
tZ	<i>trans</i> -Zeatina
UDO	Unidades de densidad óptica

## 1. INTRODUCCIÓN

Durante la senescencia foliar, la asimilación de carbono se reemplaza por el catabolismo de clorofila y macromoléculas como proteínas, lípidos de membranas y ARN. El material acumulado durante la fase de crecimiento se transforma en nutrientes exportables para los órganos en desarrollo (Lim *et al.*, 2007). Parte de la energía requerida para la remobilización de éstos, se obtiene por el incremento de la respiración (Hopkins *et al.*, 2007).

Algunas enzimas que intervienen en este proceso se han estudiado ampliamente, por ejemplo, glutamina sintetasa 1 (GS1) y glutamato deshidrogenasa (GDH) (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). Otras, por el contrario, enzimas como fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) se han estudiado poco durante esta fase del desarrollo. Estas últimas enzimas se encuentran en diferentes tejidos de las plantas, especialmente en aquéllos con un metabolismo de nitrógeno activo; por ejemplo, semillas en desarrollo, raíz, frutos y hojas senescentes (Walker *et al.*, 2001; Delgado-Alvarado *et al.*, 2007).

Los carbohidratos y algunos reguladores de crecimiento son elementos internos que inducen la senescencia (Jordi *et al.*, 2000; Pourtau *et al.*, 2006). Durante esta fase los hidratos de carbono tienen diferentes funciones: intervienen en el control de la fotosíntesis (Wingler *et al.*, 1998), son elementos centrales en las relaciones fuente-demanda (Yoshida, 2003; Roitsch y Ehneß, 2000) e inducen y regulan enzimas involucradas en la movilización de nitrógeno (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2000). La señalización de los azúcares se regula mediante la hexocinasa como azúcar sensor (Pourtau *et al.*, 2006).

La aplicación externa de citocininas o las modificaciones genéticas mediante la sobre expresión del gen isopentenil fosfotransferasa (*IPT*), tienen efectos directos en la senescencia

foliar. Por ejemplo: retrasa la degradación de clorofila (Palavan-Ünsal *et al.*, 2002), la formación de plastoglobulos, el incremento en la permeabilidad de la membrana, disminuye la peroxidación de lípidos e inducen la actividad de enzimas antioxidantes (Vlcková *et al.*, 2006). También se conserva la actividad fotosintética por más tiempo, fijación de CO<sub>2</sub> y se incrementa la eficiencia fotoquímica del fotosistema II; PSII (Wingler *et al.*, 2004).

En el presente estudio se determinó el efecto de la citocinina 6-bencilaminopurina (BAP) en el metabolismo primario de la segunda hoja de *Triticum aestivum* L cv. Temporalera, durante la senescencia. Mediante la cuantificación de los pigmentos fotosintéticos, proteínas solubles totales, aminoácidos totales y carbohidratos. También se determinó el efecto de éste regulador de crecimiento en Rubisco, principal enzima fotosintética, y la actividad de PEPCK y PEPC.

La aspersión externa de BAP tuvo importantes efectos en el metabolismo primario de la segunda hoja senescente de trigo. Las hojas tratadas con la citocinina conservaron 40% de su clorofila total, mientras que el testigo presentó 8% a los 41 días después de la siembra (DDS). En relación con las proteínas solubles, las hojas tratadas con el regulador de crecimiento mantuvieron 30%, en cambio el testigo sólo 2% en ésta fecha. BAP indujo una mayor acumulación de hexosas y actividad enzimática de PEPCK y PEPC. Además, la integridad de la membrana no se alteró, en comparación con el testigo. En conclusión, BAP modificó los procesos de degradación natural de las macromoléculas del metabolismo primario, que en conjunto promovieron el retraso de la senescencia foliar.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Senescencia foliar

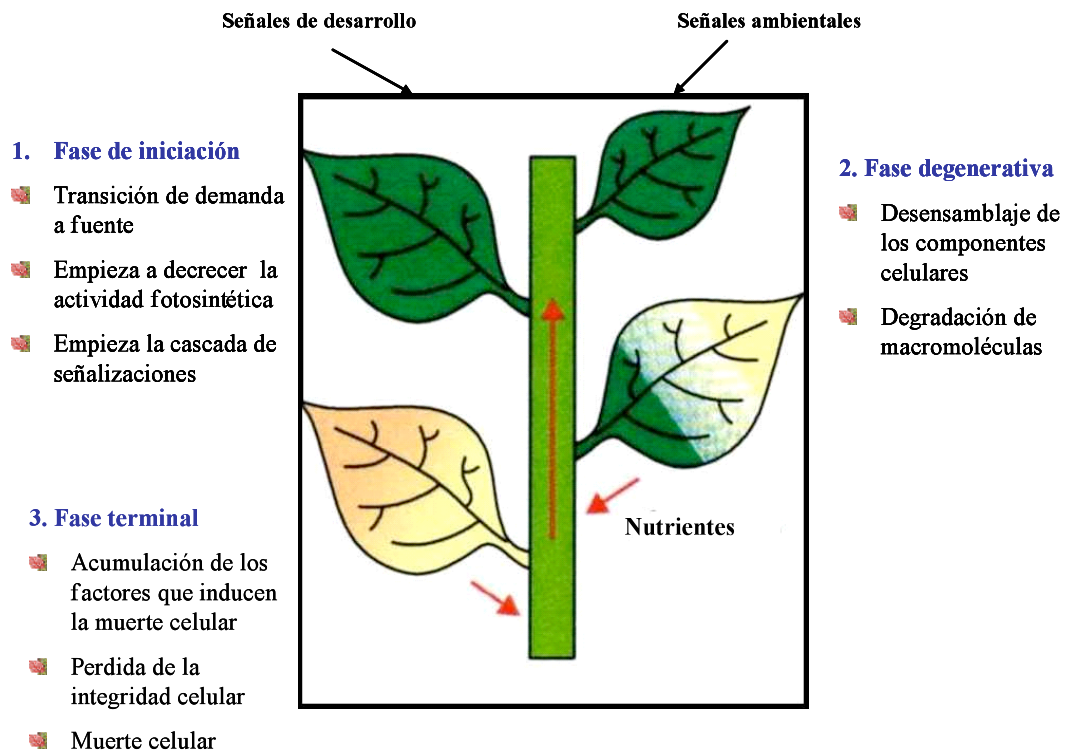
La senescencia foliar es considerada como la destrucción de los componentes celulares durante un intervalo de tiempo específico, antes de la muerte celular (Parrot *et al.*, 2007). Es controlada por el núcleo y requiere de la expresión de los genes asociados a la senescencia (SAGs), agrupados en más de 20 familias. Estos codifican enzimas para la degradación como: proteasas, lipasas, nucleasas y enzimas transportadores de nutrientes (Hopkins *et al.*, 2007). Zimmermann y Zentgraf (2005) los clasifican en dos grupos: genes específicos de la senescencia (clase I) y genes que incrementan su expresión gradualmente (clase II). Un ejemplo de la clase I es el SAG 12, que codifica para proteasas cisteínas y se expresa específicamente durante este proceso, por lo cual se usa frecuentemente como marcador molecular.

El inicio de este proceso depende de la edad del órgano; sin embargo, la iniciación y progresión es modulada por factores internos y externos (Woo *et al.*, 2001). Entre los factores internos se encuentran: azúcares, diferenciación celular, reproducción, señales del desarrollo y reguladores de crecimiento; y entre los externos: ataque de patógenos, sequía, disponibilidad de nutrientes, luz y temperatura (Woo *et al.*, 2001; Gregersen y Holm, 2007).

Los diferentes procesos bioquímicos y fisiológicos de la senescencia foliar, Yoshida (2003) los clasificó en tres fases: iniciación, degeneración y terminal (Figura 1). Los factores que inducen la primera fase son la edad y las señales ambientales, donde se llevan a cabo cambios metabólicos acompañados por la transición de convertirse de un órgano demanda a ser fuente de nutrientes (N, C, P, S, K y varios metales) (Himmelblau y Amasino, 2001). La segunda fase se caracteriza por la desintegración de los componentes celulares y la



degradación de las macromoléculas como: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, donde los productos son translocados a los órganos demanda (hojas jóvenes, semillas en desarrollo y frutos). Finalmente, durante la fase terminal ocurre la muerte celular. En una clasificación semejante, Zimmermann y Zentgraf (2005) señalan que en la última fase, la célula pierde la integridad y viabilidad. Se desintegra el núcleo, mitocondria, vacuolas y aumentan los radicales libres.



**Figura 1.** Tres fases de la senescencia foliar y sus características fisiológicas. Las hojas de la parte inferior del esquema son senescentes, y las flechas dentro del esquema indican la dirección del transporte de nutrientes (Yoshida, 2003).

El conocimiento de los procesos que se llevan a cabo durante la senescencia tiene importantes aplicaciones biotecnológicas como: el incremento de la productividad de las plantas, almacenamiento de postcosecha y tolerancia al estrés (Lim *et al.*, 2007). En cereales

es importante aplicarlo en la manipulación de la movilización de nutrientes para mejorar el rendimiento (Gregersen y Holm, 2007).

En la siguiente sección, se explica el catabolismo de los principales componentes celulares implicados en el metabolismo primario durante la senescencia foliar, con énfasis en la clorofila, proteínas y azúcares. Se describen también las siguientes enzimas: Rubisco, fosfoenolpiruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxinasa.

### 2.1.1 Catabolismo de pigmentos fotosintéticos

#### 2.1.1.1 Clorofilas

El proceso más notable de la senescencia foliar es la transición de cloroplastos a gerontoplastos. En éste organelo se llevan a cabo una serie de procesos catabólicos como la degradación de: clorofilas, apoproteínas, membranas tilacoidales y enzimas estromales (Keskitalo *et al.*, 2005).

Las clorofilas, pigmentos que absorben luz en las membranas de los tilacoides y la canalizan a los centros de reacción, pierden su estructura por lo cual disminuye la fotosíntesis, el estado verde de la planta y además se modifica la comunicación núcleo-cloroplasto (Eckhardt *et al.*, 2004; Tanaka y Tanaka 2006). En esta transformación se generan radicales libres tóxicos para la célula que son transferidos a la vacuola por un sistema de transportadores del tonoplasto dependientes de ATP (adenosina trifosfato) (Eckhardt *et al.*, 2004; Hörtensteiner, 2006). Los cuatro moles de nitrógeno asociados a cada molécula de clorofila no son reciclados, pero son aprovechados por los microorganismos del suelo cuando la hoja se cae (Matile *et al.*, 1999; Hörtensteiner y Feller, 2002).

En la degradación de estos pigmentos fotosintéticos están involucradas varias enzimas, el gerontoplasto y las vacuolas. El primer paso de la vía metabólica consiste en remover las clorofilas de los tilacoides a la membrana interna del cloroplasto para ponerlas en contacto con las enzimas catabólicas. Primero la clorofila *b* se convierte en *a* para ser degradadas por una misma vía. La clorofila *a* se transforma en feoforbide *a* por la clorofilasa y la Mg-dequelasa, dos enzimas que subsecuentemente remueven el fitol y el átomo de Mg, respectivamente (Hörtensteiner, 2006). Después la feoforbide *a* oxigenasa (PaO), responsable de la pérdida del color verde, cataliza la degradación de los anillos tetrapirrólicos a catabólitos rojos de clorofila (RCC) (Hörtensteiner y Feller, 2002; Pružinská *et al.*, 2007). Estos productos son inmediatamente metabolizados por la enzima del estroma RCC reductasa (RCCR) para convertirlos en catabólitos fluorescentes de clorofila (FCCs). Estas dos últimas enzimas son primordiales para la desintoxicación de los metabolitos de clorofila (Pružinská *et al.*, 2007). Los FCCs sufren varias modificaciones de tautomerización no-enzimática dentro de la vacuola y se almacenan en forma de NCCs (catabólitos no-fluorescentes de clorofila). Químicamente ellos representan derivados tetrapirrólicos de la clorofila por la abertura oxigenolítica de la estructura policíclica de porfirina (Hörtensteiner y Feller, 2002).

### 2.1.1.2 Carotenoides y xantofilas

Las membranas tilacoidales contienen pigmentos secundarios que absorben la luz, llamados conjuntamente pigmentos accesorios (Lehninger *et al.*, 1995). Esta clase de pigmentos incluyen los carotenoides y sus derivados oxigenados, las xantofilas (violaxantinas, anteroxantinas, zeaxantinas, neoxantinas y luteínas). El color amarillo y naranja de las hojas senescentes se debe a la lenta degradación de los carotenoides, respecto a las clorofilas

(Ougham *et al.*, 2005). En el estudio realizado por Keskitalo *et al.* (2005) demostraron que durante la senescencia foliar de álamo temblón (*Populus tremula*), luteína y  $\beta$ -caroteno se degradan paralelamente con la clorofila, mientras que la neoxantina y las xantofilas fueron retenidas por más tiempo.

La disminución en la capacidad fotosintética expone a las hojas senescentes al exceso de energía de excitación, la cual si no se disipa causa daños al fotosistema II (PSII), por la sobre-reducción de los centros de reacción. Las xantofilas (zeaxantinas y antheroxantinas) disipan esta energía como calor (Lu *et al.*, 2001; Wingler *et al.*, 2004).

### 2.1.2 Degradación de proteínas

Debido a que las proteínas presentan un alto porcentaje de nitrógeno, así como de carbono, azufre, hierro y fósforo, constituyen una importante fuente de nutrientes y minerales para los órganos demanda. La mayoría de proteínas translocables están dentro del cloroplasto, de hecho almacena más del 75% de nitrógeno (Hopkins *et al.*, 2007), donde Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa) y las proteínas-clorofílicas cosechadoras de luz del PSII (LHCP IIs) están presentes en mayor cantidad. Rubisco es directamente degradada, mientras que las LHCP II son más estables y requieren primero ser modificadas, con la finalidad de remover las moléculas de clorofila (Hörtensteiner y Feller, 2002).

El catabolismo de las proteínas como Rubisco y glutamina sintetasa 2 (glutamina sintetasa 2, GS2), se inicia por especies reactivas de oxígeno (ROS), aminopeptidasas, metaloendopeptidasas, proteasas dependientes de ATP (Clp, FtsH y Lon) y proteasas de la vacuola. Por ejemplo, la FtsH6 está involucrada en la desintegración del LHCII (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Sakamoto, 2006). La actividad de estas enzimas y ROS originan

cambios en las características fisiológicas de las células; así el pH celular al inicio de la senescencia se encuentra entre 5-6, el cual es característico de las proteasas vacuolares, mientras que durante las últimas fases alcanza valores de 8 (Masclaux *et al.*, 2001).

### 2.1.2.1 Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco; EC 4. 1. 1. 39)

Rubisco es una enzima bifuncional que cataliza la asimilación de CO<sub>2</sub> durante la fotosíntesis e interviene en la fotorespiración en el estroma de los cloroplastos (Chiba *et al.*, 2003). La enzima está conformada por ocho subunidades grandes (LSU) idénticas de 55 kDa cada una (codificadas por el cloroplasto, particularmente por el gen *rbcL*) y ocho subunidades pequeñas (SSU) idénticas de 14 kDa cada una (codificadas por el núcleo, por el gen *rbcS*), lo que hace un total de 560 kDa para toda la enzima (Parry *et al.*, 2002). Esta es la proteína más abundante de las hojas, la cual representa del 40-50% de las proteínas solubles y del 20-30% del nitrógeno total en las hojas maduras de las plantas C<sub>3</sub> (Masclaux *et al.*, 2001).

La degradación se realiza dentro de los cloroplastos y en el citoplasma. El rompimiento no enzimático de la LSU en 37 kDa y 16 kDa es inducida por ROS (especies reactivas de oxígeno) (Hörtensteiner y Feller, 2002; Nakano *et al.*, 2006). La fragmentación ha sido identificada en la glicina 329, cercana al sitio activo por la reacción de Fenton (Luo *et al.*, 2002). En el citoplasma Chiba *et al.* (2003) encontraron que durante la senescencia natural de las hojas de trigo se forman cuerpos esféricos que contienen Rubisco y productos de degradación, excepto proteínas tilacoidales, por lo que se considera que estas proteínas utilizan vías diferentes de degradación.

### 2.1.3 Azúcares

Los azúcares como parte central del metabolismo primario presentan diferentes funciones en la planta: constituyen los esqueletos carbonados para la biosíntesis de ATP, energía redox, y están involucrados en la transducción de señales (Lalonde *et al.*, 2004; Yoshida, 2003). Intervienen en la biosíntesis de antocianinas,  $\beta$ -oxidación y el metabolismo de N. Además de regular diferentes procesos como: el desarrollo de las semillas, formación de estructuras celulares, tiempo de floración y la senescencia (Lalonde *et al.*, 2004; Yoshida, 2003).

Sin embargo, la relación exacta de los azúcares con algunos procesos, aún no está clara. Particularmente la relación que tienen los azúcares con la senescencia (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Wingler *et al.*, 2006). Al respecto, Pourtau *et al.* (2006) señalan que la respuesta es diferente entre la senescencia inducida y la natural. Cuando fragmentos de hojas se colocan en oscuridad, los azúcares disminuyen. Paul y Pellny (2003) señalan que bajo este tratamiento los azúcares pueden tener una función tanto de inducción como de represión de genes SAGs. En tabaco, Masclaux-Daubresse *et al.* (2005) demostraron que fragmentos de hojas en oscuridad y con la adición de sacarosa induce la expresión de glutamina sintetasa citosólica (GS1), pero no de glutamato dehidrogenasa (GDH).

Por el contrario, durante la senescencia natural, se demostró que el contenido de azúcares incrementa en varias especies de plantas; por ejemplo en: *Nicotina tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, *Ricinus communis* y *Zea mays* (Noodén *et al.*, 1997; Wingler *et al.*, 1998; Jongebloed *et al.*, 2004). Se sabe que el proceso es regulado por varios factores; entre ellos el estatus C:N, luz, reguladores de crecimiento, las relaciones fuente-demanda y la etapa de desarrollo de la planta (Wingler *et al.*, 1998; Yoshida, 2003; Wingler *et al.*, 2006).

Además, existe variación en la cantidad y tipo de azúcar que acumulan. Algunas especies almacenan sacarosa y almidón, y otras almacenan polioles (e.g. sorbitol). Ciertas monocotiledóneas acumulan fructanos, sin embargo, las hojas de trigo acumulan azúcares solubles (Sharma-Natu y Ghildiyal, 2005).

Se desconoce de donde se originan los azúcares que son almacenados, a pesar de la disminución de la fotosíntesis. Sin embargo, Wingler *et al.* (1998) proponen que se originan de la degradación del almidón y de la exportación preferencial de nitrógeno. Por su parte, Jongebloed *et al.* (2004) demostraron que se debe al bloqueo del floema por la deposición de calosa. Sin embargo, no se ha podido explicar como se lleva cabo el transporte de nutrientes bajo estas condiciones (Wingler *et al.*, 2006) y en cuales células se almacenan (Pourtau *et al.*, 2006). No obstante, se demostró recientemente que los azúcares regulan importantes aspectos de la senescencia tanto inducida como natural (Wingler *et al.*, 2006).

### 2.1.3.1 Función de los azúcares durante la senescencia foliar

Las principales funciones de estos compuestos durante la senescencia son:

#### A) Regulación de la fotosíntesis.

Se ha demostrado que la inhibición de la acumulación de azúcares en las hojas, retrasa la senescencia de este órgano. Yoshida (2003) señala que las hojas jóvenes que se mantienen en la sombra, no maduran su aparato fotosintético y permanecen como órgano demanda, lo cual retrasa la senescencia en las hojas fuente.

El incremento de los hidratos de carbono, disminuye la fotosíntesis, por medio de la inmovilización del fósforo inorgánico ( $P_i$ ). En hojas de trigo, éste proceso limita la capacidad de regeneración de Rubisco, por la disminución de ATP, esencial para el funcionamiento de rubisco activasa que activa esta enzima fijadora de  $CO_2$ . Además, en el citosol de las células

del mesófilo, la hexocinasa genera una cascada de señales, que reprimen la expresión de genes fotosintéticos (Sharma-Natu y Ghildiyal, 2005). Este mecanismo se evidenció en plantas transgénicas mediante la sobre-expresión de una hexocinasa específica (hexocinasa-1), que es el azúcar señalizador, al mostrar las plantas una senescencia prematura, debido a que se incrementa la sensibilidad a los azúcares (Dai *et al.*, 1999). Por el contrario, en plantas mutantes de *Arabidopsis* con el gen *glucosa-insensible2 (gin2-1)*, la senescencia se retrasa, debido a que afecta la señalización de glucosa y la fosforilación (Moore *et al.*, 2003).

Por otra parte, Wingler *et al.* (1998) encontraron que fragmentos de hojas de tabaco sumergidos en una solución de glucosa disminuye la actividad de hidroxipiruvato reductasa. Esta enzima cataliza la reducción de hidroxipiruvato a glicerato, en el ciclo fotorespiratorio, esencial para el metabolismo fotosintético.

### **B) Inducen enzimas implicadas en la movilización de nutrientes.**

Estudios fisiológicos demostraron que los máximos niveles en el contenido de azúcares coincide con el inicio de la senescencia en hojas de tabaco y *arabidopsis* (Masclaux *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2005). Las enzimas involucradas en la movilización de nutrientes son inducidas por los azúcares. Por ejemplo, Masclaux *et al.* (2000) señalan que en tabaco GS1, GDH y la actividad proteolítica se inducen en el momento que los azúcares alcanzan sus máximos valores. Resultados semejantes fueron reportados por Pourtau *et al.* (2006) quienes encontraron que la aplicación externa de glucosa provocó la expresión de algunos genes SAGs (SAG 12, SAG 13 y SRG 2) y enzimas involucradas en el metabolismo de nitrógeno y de carbohidratos. Por su parte, Parrott *et al.* (2007) demostraron que el bloqueó del floema en cebada (*Hordeum vulgare*) ocasionó el almacenamiento de azúcares en las hojas y estímulo la expresión de genes SAGs y de diferentes enzimas involucradas en el catabolismo de



macromoléculas, como aminopeptidasas, proteasas y aspartil peptidasa (cnd41). Esta última implicada en la degradación de Rubisco.

### 2.1.4 Almidón

Es un polisacárido de reserva que se encuentra en el interior de la célula y forma gránulos. Contiene dos tipos de polímeros de glucosa: amilasa y amilopectina (Lehninger *et al.*, 1995). Estos carbohidratos se acumulan durante el día y se degradan durante la noche o cuando la fotosíntesis es baja, proporciona los sustratos para la respiración, síntesis de sacarosa y otros metabolitos translocables (Zeeman *et al.*, 2004). Además, puede originar hexosas libres, producto de la actividad de fosforilasas o por la hidrólisis de las amilasas que forman moléculas de glucosa. Las cuales pueden reincorporarse al metabolismo, después de su fosforilación por medio de las hexocinasas y fructocinasas (Koch, 2004).

En hojas de *Arabidopsis* se han identificado diferentes enzimas como amilasas  $\alpha$  y  $\beta$ , glucosidasas, enzimas desramificadoras (mezcla de hidrolasas y transferasas) y fosforilasas de almidón. La presencia de hidrolasas y fosforilasas en las células, sugiere la generación de glucosas libres e intermediarios fosforilados al mismo tiempo (Zeeman *et al.*, 2002).

Durante la senescencia foliar natural de pepino (*Cucumis sativus*), Shaffer *et al.* (1991) encontraron una acumulación de este polisacárido. Jongebloed *et al.* (2004) observaron un incremento gradual en las hojas senescentes de higuera (*Ricinus communis*). En plantas de tabaco los máximos niveles se alcanzaron al mismo tiempo que los azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa), en las hojas de transición fuente-demanda (Masclaux *et al.*, 2000).

### 2.1.5 Degradación de lípidos

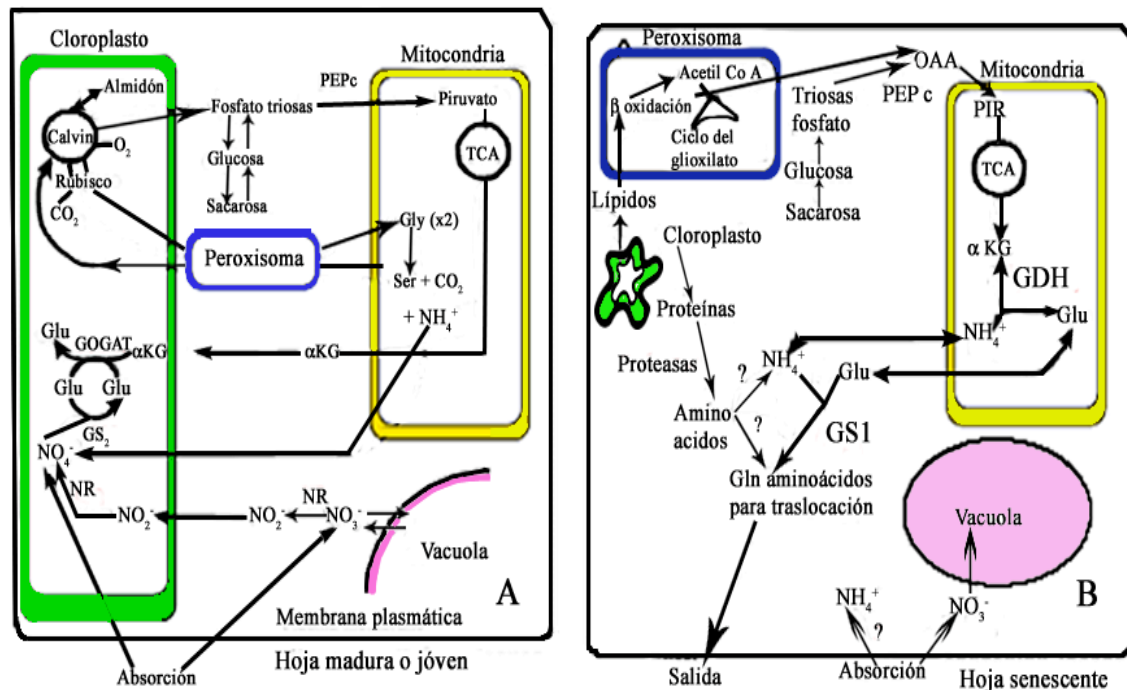
La degradación de lípidos es activada durante la senescencia foliar (Yoshida, 2003). En este proceso, hay una pérdida gradual de la integridad de las membranas, las cuales proporcionan moléculas de lípidos requeridos para la generación de energía, ya que los cloroplastos dejan de producir nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH) y ATP, y se requieren para los diferentes procesos catabólicos. Las membranas tilacoidales constituyen la fuente principal de carbono para la biosíntesis de ATP (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Hopkin *et al.*, 2007).

En *Arabidopsis* se conocen aproximadamente 11 lipasas/acil hidrolasas, seis fosfolipasas y dos lipoxigenasas, involucradas en la degradación de los lípidos (Hopkin *et al.*, 2007). Los ácidos grasos producto del catabolismo son metabolizados a acetil coenzima A (CoA) por medio de la  $\beta$ -oxidación, dentro de los glioxisomas. El acetil-CoA se utiliza para respiración o en algunas plantas es convertido a oxalacetato para la generación de sacarosa por la gluconeogénesis (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Hopkin *et al.*, 2007).

En *Arabidopsis*, los genes que codifican para enzimas del ciclo del glioxilato (isocitrato liasa y malato sintetasa), requeridas para la conversión de ácidos grasos en azúcares, no se inducen durante la senescencia. Por lo tanto, la gluconeogénesis no tiene una función importante en esta especie durante este proceso. En hojas senescentes de trigo, Gregersen y Holm (2007) tampoco encontraron estas enzimas. Sin embargo, en calabaza, cebada y pepino sí están presentes (Charlton *et al.*, 2005).

## 2.1.6 Translocación de nutrientes

Algunos nutrientes son trasladados a los órganos demanda sin ninguna modificación. Sin embargo, otros requieren ser transformados, y utilizan ciertos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) o ciclo de Krebs. Este ciclo es anfibólico (es decir, se usa tanto en procesos anabólicos como catabólicos). Funciona en el catabolismo oxidativo de glúcidos, ácidos grasos y aminoácidos. Además, genera precursores de muchas vías biosintéticas. Mediante la acción de varias enzimas auxiliares ciertos compuestos del TCA, y en particular el  $\alpha$ -cetoglutarato y el oxalacetato pueden salir y actuar como precursores de aminoácidos (Figura 2). El aspartato y el glutamato poseen los mismo esqueletos carbonados del oxalacetato y el  $\alpha$ -cetoglutarato, respectivamente, y se sintetizan a partir de ellos mediante una transaminación (Masclaux *et al.*, 2000, 2001).



**Figura 2.** Principales vías del metabolismo de nitrógeno y carbono en las células del mesófilo de hojas jóvenes (A) y senescentes (B) de tabaco. Las vías desconocidas son indicadas por el signo de interrogación (Masclaux *et al.*, 2001).

La formación de glutamina es catalizada por la glutamina sintetasa citoplasmática (GS1) y la enzima mitocondrial glutamato dehidrogenasa dependiente de NADH (GDH-NADH), a partir de amonio y glutamato (Masclaux *et al.*, 2000, 2001) (Figura 2). Los aminoácidos, azúcares y amonio regulan la expresión y actividad de GS1 y GDH en las hojas senescentes, lo que indica que el estatus nutricional (C:N) de las plantas está relacionado con la remobilización de nutrientes y la senescencia (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2005). La asparagina es sintetizada del aspartato por la enzima asparagina sintetasa. El aspartato puede formarse de glutamina por la aspartato aminotransferasa. La glutamina es el principal aminoácido transportable durante la senescencia natural, mientras que en tratamientos en oscuridad es la asparagina (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005).

Además de las enzimas antes mencionadas, existen otras que proporcionan los precursores para síntesis de glutamina, por ejemplo; la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y fosfoenolpiruvato carboxinasa (PEPCK) (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). En hojas senescentes de trigo, Gregersen y Holm (2007) señalan que PEPC forma parte del sistema citósol /peroxisomas, que se lleva a cabo para el reciclamiento del nitrógeno.

### **2.1.7 Fosfoenolpiruvato carboxinasa (PEPCK)**

Es una enzima citosólica, codificada por el genoma nuclear. Existen dos tipos de PEPCKs la que depende del nucleótido de adenina (PEPCK-ATP: EC 4. 1. 1. 49) y la que utiliza guanina (PEPCK-GTP: EC 4. 1. 1. 32). La primera está presente en plantas, ascomicetos, basidiomicetos, algas caféas, algas rojas, diatomeas, dinoflagelados y algunas bacterias. Mientras que la enzima dependiente- de guanina trifosfato (GTP) se encuentra en

mamíferos, aves, peces, insectos, moluscos, nematodos y otras bacterias (Leegood y Walker 2003).

En plantas la enzima se localiza en varios tejidos: estructuras involucradas en la defensa, tricomas, conductos de resina, flores, frutos, raíces, semillas en desarrollo, tejido vascular, estomas, hojas de plantas C<sub>3</sub> (plantas cuyo primer producto estable de la fijación del CO<sub>2</sub> es el ácido 3-fosfoglicérico, de tres carbonos), C<sub>4</sub> (plantas que fijan el CO<sub>2</sub> en ácido málico o aspártico, de cuatro carbonos) y CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas) (Walker *et al.*, 2001, 2002).

En el citósol de las células, PEPCK cataliza la descarboxilación de oxalacetato (OAA) a fosfoenolpiruvato (PEP) en una reacción dependiente de Mg<sup>2+</sup> en la que el ATP es el donador de fosfatos (Leegood y Walker, 2003; Rylott *et al.*, 2003).

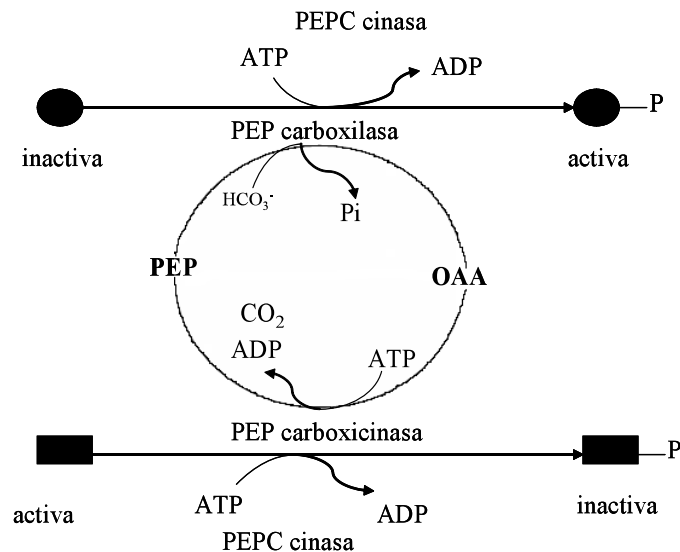


### 2.1.7.1 Propiedades de PEPCK

Es una enzima multimérica de subunidades idénticas (Walker *et al.*, 2002). En hojas de plantas C<sub>4</sub> como: pasto guinea (*Panicum maximum*), avena (*Urochloa panicoides*) y pasto rhodes (*Chloris gayana*), es un hexamero, pero en pepino (*Cucumis sativus*) es tetramérica (Walker *et al.*, 1995).

La masa molecular varía entre las diferentes especies; por ejemplo, en los tejidos C<sub>3</sub>, la enzima tiene una masa molecular de 74 kDa, en las plantas CAM de 78 kDa, mientras que en las plantas C<sub>4</sub> es más pequeña y varía entre las diferentes especies (67-71 kDa) (Walker y Leegood, 1996).

Algunos intermediarios fotosintéticos inhiben la actividad de PEPCK como: glucosa 6-fosfato (G6P), fructosa 1-6-bifosfato (F1-6 BP), 3 fosfogliceraldehído (3-PGA) y PEP. Además, la relación ATP/ADP modula la afinidad de PEPCK por el OAA (Leegood y Walker, 2003). También la enzima es regulada por un mecanismo selecto que involucra una fosforilación reversible de la proteína dependiendo de las condiciones oscuridad e iluminación (Walker y Leegood, 1995, 1996). La fosforilación inactiva a la PEPCK; mientras que a la PEPC la activa. Ambas enzimas son reguladas por proteínas cinasas dependientes de adenosina monofosfato (cAMP) (Figura 3). La interacción estrecha entre estas enzimas fue demostrada en *Corynebacterium glutamicum*, en donde de dos a tres OAA sintetizados por PEPC son reciclados por PEPCK. Este ciclo de sustratos puede servir para regular el flujo entre PEP y OAA, para mantener las concentraciones adecuadas (Leegood y Walker, 2003).



**Figura 3.** Reacciones catalizadas por PEPCK y PEPC y su regulación (Leegood y Walker, 2003).

### 2.1.7.2 Funciones de PEPCK

Las funciones catalizadas por PEPCK ocupan una posición central en el metabolismo carbono y nitrógeno y es una interfase entre el metabolismo de aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, lípidos y algunos metabolitos secundarios (Walker *et al.*, 2001).

Una de las funciones más estudiadas de esta enzima es la descarboxilación del OAA en el subgrupo de las PEPCKs de las plantas C<sub>4</sub> y en varias plantas CAM. Sin embargo, recientemente, también se observó que se encuentra presente en diferentes tejidos de las plantas, como en las hojas de pastos y maíz que pertenecen a las de tipo de la enzima malico dependiente de nicotinamina adenina dinucleótido (NAD-ME) (Walker *et al.*, 2001).

En las plantas C<sub>3</sub>, también se ha detectado actividad de esta enzima, por ejemplo; en la coliflor (*Brassica oleracea*), uvas (*Vitis vinifera*), manzanas (*Malus domestica*), kiwi (*Actinidia deliciosa*) y berenjena (*Solanum melongena*). De acuerdo a estudios de inmunolocalización se ha evidenciado que interviene en el metabolismo de nitrógeno y en la regulación del pH (Walker *et al.*, 2001). Además, Häusler *et al.* (2002) señalan que en este grupo de plantas la enzima interviene en la gluconeogénesis y en el metabolismo secundario. PEPCK incrementa su actividad en tejidos con metabolismo activo de nitrógeno; por ejemplo, recientemente Delgado-Alvarado *et al.* (2007) observaron que la máxima actividad de PEPCK se alcanzó durante el transporte y metabolismo de asimilados. En plantas de maíz, la enzima se localizó en el pedicelo donde los aminoácidos son degradados. También, durante la maduración de algunos frutos como las uvas y durazno, la enzima se encontró en los tejidos vasculares donde se transforman los compuestos nitrogenados antes de ser redistribuidos (Walker *et al.*, 2001).

Las plantas regulan su pH principalmente por dos vías: por el acoplamiento de

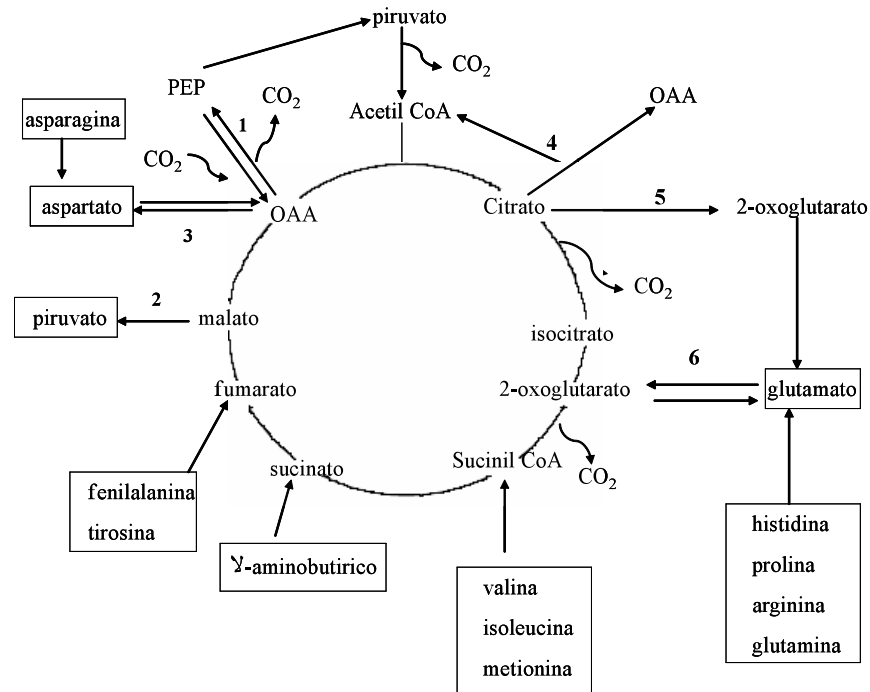
protones a la membrana plasmática y por una regulación bioquímica. Por medio de esta última vía, PEPCK interviene en la regulación del pH, a través de la descarboxilación del oxalacetato derivado del malato, proceso que consume protones (Walker *et al.*, 2001).

Además, Owen *et al.* (2002) y Leegood y Walker (2003) mencionan que tiene una función cataplerótica en el ciclo de TCA, en la descarboxilación del oxalacetato, dado que sólo se liberan dos moléculas de CO<sub>2</sub>, y la concentración de intermediarios podría incrementar y se requiere que durante el catabolismo de aminoácidos, el equilibrio de entrada y salida de intermediarios del TCA se mantenga (Figura 4).

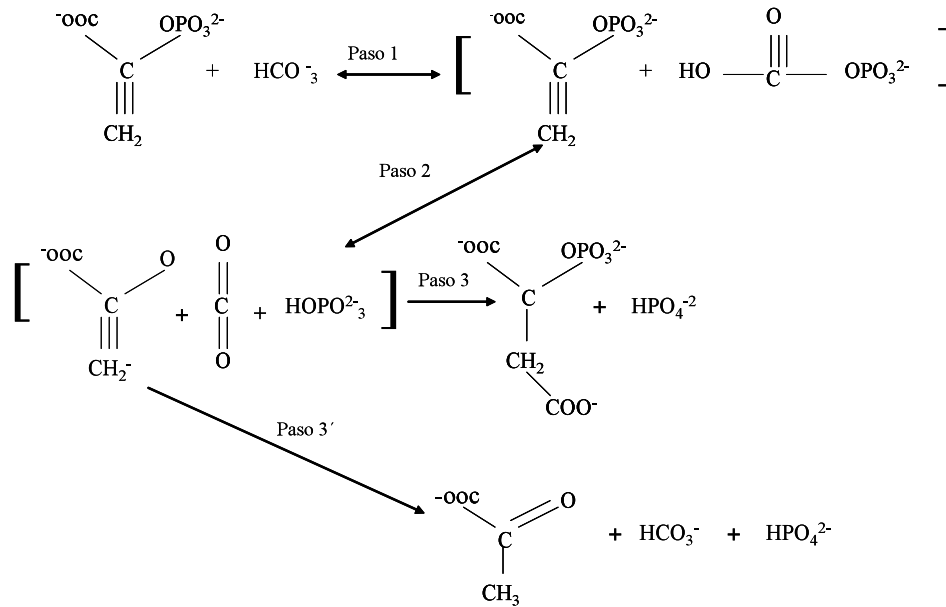
### 2.1.8 Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC; EC 4.1.1.31) es una enzima citosólica distribuida tanto en organismos fotosintéticos (plantas y algas verdes), como en no fotosintéticos (bacterias y protozoos). Sin embargo, no se encuentra en animales, hongos y levaduras (Izui *et al.*, 2004). Cataliza la  $\beta$ -carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato (PEP) en presencia de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y Mg<sup>2+</sup>, para producir OAA y Pi (Izui *et al.*, 2004) (Figura 3). El complejo Mg-PEP es el verdadero sustrato de PEPC, al actuar el PEP libre como un activador alostérico y el Mg<sup>2+</sup> como un inhibidor alostérico débil no competitivo (Tovar-Méndez *et al.*, 2000) (Figura 5).





**Figura 4.** Funciones anaplóticas y cataplóticas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Reacciones de alimentación de carbono al ciclo, a partir de acetil CoA, incluye la entrada de los productos de degradación de aminoácidos y la generación de OAA de PEP por PEPC. Reacciones cataplóticas que conducen a la eliminación de los intermediarios del ciclo de Krebs, por medio de PEPC (1), el cual genera PEP para la gluconeogénesis o para la formación de piruvato, nicotinamida adenina dinucleótido NAD-(P) enzima málico (2) genera piruvato a partir de malato en el citósol o cloroplasto para la síntesis de lípidos, aminotransferasas aspartato (3), citrato liasa (4), aconitasa y isocitrato dehidrogenasa (5) para generar 2-oxoglutarato en el citósol, reacciones para originar glutamato (6) (Leegood y Walker, 2003).



**Figura 5.** Mecanismo de carboxilación de fosfoenolpiruvato (PEP) por la fosfoenolpiruvato carboxilasa en una reacción de tres pasos. Paso 1. Formación del anión enolato de piruvato y carboxifosfato a partir de fosfoenolpiruvato y bicarbonato por una reacción parcial reversible; Paso 2. El anión enolato se isomeriza y el carboxifosfato se divide en dióxido de carbono y fosfato; Paso 3. El dióxido de carbono ataca electrofílicamente al anión enolato para formar oxalacetato y liberar fosfato; Paso 3' Una parte de la reacción de hidrólisis de fosfoenolpiruvato dependiente de bicarbonato genera piruvato y fosfato (Izui *et al.*, 2004).

### 2.1.8.1 Propiedades de PEPC

Es una enzima homotetramérica compuesta de subunidades que se organizan en dímeros. Codificada por una pequeña familia de multigenes. El número aproximado de residuos de aminoácidos es de 870 (100 kDa), 970 (110 kDa), 1010 (116 kDa) y 1150 (134 kDa) para bacterias, plantas vasculares, cianobacterias y protozoarios, respectivamente (Golombek *et al.*, 1999; Izui *et al.*, 2004). El sitio activo de esta enzima se conforma por residuos de histidina, localizados en el sitio 268 (Izui *et al.*, 2004).

La transcripción de PEPC se ve afectada por factores nutricionales y ambientales en procesos que están mediados o no por hormonas. Por ejemplo, en cebada (*Hordeum vulgare*), planta C<sub>3</sub>, el estrés salino y el ácido abscísico (ABA) disminuyen la velocidad de asimilación de CO<sub>2</sub>, el contenido en clorofila, proteínas y la actividad de Rubisco, sin embargo, se incrementa la actividad de PEPC (Popova *et al.*, 1995). En plántulas de trigo se ha descrito que el tratamiento con NaCl y LiCl, además de otros estreses como hipoxia o frío, provocan un aumento de la expresión de PEPC (González *et al.*, 2003). Las citocininas modifican la expresión de esta enzima; en la hierba del roció (*Mesembryanthemum crystallinum* L), Schmitt y Piepenbrock (1992) encontraron que la aplicación externa de BAP, disminuye la expresión de esta enzima. Por el contrario, Sugiharto *et al.* (1992) demostraron que en fragmentos de hojas de maíz, este regulador de crecimiento estimula la síntesis de PEPC.

La PEPC esta sometida al control metabólico por una gran variedad de efectores alostéricos positivos (G-6-P, F1-6-BP y triosas-fosfato) y negativos (L-Malato, OAA y aspartato) (Raghavendra *et al.*, 1993). *In vivo*, la actividad PEPC depende del balance entre estos efectores, modulándose la magnitud de sus efectos por el pH citosólico y que provoca una transición alostérica de una conformación estable de alta afinidad a otra forma relajada transitoria de baja afinidad (Frank *et al.*, 2001).

La fosforilación reversible de PEPC, se lleva a cabo en hojas C<sub>4</sub> y CAM, nódulos de raíces, hojas de plantas C<sub>3</sub>, estomas, frutos, incluso en plantas acuáticas, como en elodea (*Egeria densa*) (Casati *et al.*, 2000). La adición de la carga negativa del fosfato es crucial en el mecanismo de regulación, responsable de los cambios en las propiedades cinéticas y características de cada isoenzima (Duff *et al.*, 1995).

### 2.1.8.2 Funciones de PEPC

Además de su participación en la fotosíntesis C<sub>4</sub> y CAM, las funciones asignadas a PEPC son numerosas. El producto final estable estable (L-malato) puede ser transportado y usado como fuente de carbono y poder reductor en numerosas vías metabólicas. Debido a la baja constante de Michaelis-Menten (K<sub>m</sub>) por el sustrato bicarbonato (en el rango de  $\mu$ molar) esta enzima interviene, con una función general, en la economía del carbono de la célula recapturando el CO<sub>2</sub> respiratorio. En las plantas C<sub>3</sub> se le asigna las siguientes funciones: a) anaplerótica (suministrando precursores biosintéticos al TCA) (Figura 4), b) regulación del pH celular (opera con la malato deshidrogenasa para originar malato, este proceso consume protones, para prevenir la alcalinización durante la asimilación de nitratos), c) interviene en la fijación del nitrógeno en leguminosas, d) participa en la absorción y transporte de cationes por raíces, en el movimiento estomático, germinación de semilla y en la maduración de frutos (Osuna *et al.*, 1999; Turner y Plaxton, 2000; Echevarría y Vidal, 2003; Izui *et al.*, 2004).

### 2.1.9 PEPCK y PEPC durante la senescencia

Existen escasas referencias en relación con la función de PEPC y PEPCK durante la senescencia. Sin embargo, en los estudios que se han realizado con estas enzimas afirman que intervienen en el metabolismo de lípidos y nitrógeno. Kim y Smith (1994) señalan que PEPCK se induce durante la senescencia natural de pepino; pero no en fragmentos de hojas sometidos a oscuridad. En otro trabajo, Buchanan-Wollaston (1997) menciona que la enzima esta involucrada en la degradación de lípidos a azúcares, particularmente en la conversión de oxalacetato a piruvato, paso esencial para la gluconeogénesis.

Por otra parte, Chen *et al.* (2000) demostraron que durante la senescencia foliar de cebada, PEPCK no se encuentra presente; mientras que en hojas de pepino se localizó en los haces vasculares. De acuerdo con la distribución donde se detectó PEPCK se le atribuye una función en la regulación del pH y en el transporte de aminoácidos, debido a que no se requiere de la gluconeogénesis, ya que hay un almacenamiento de azúcares durante este proceso. En este mismo estudio encontraron que PEPC se encuentra en las dos especies, y esta restringida al tejido vascular, se le atribuyen funciones semejantes a PEPCK.

En un estudio comparativo entre la senescencia inducida y natural, Buchanan-Wollaston *et al.* (2005) señalan que ambas enzimas, PEPC y PEPCK, proporcionan los precursores para la síntesis de glutamina e intermediarios del ciclo TCA. Por su parte, Gregersen y Holm (2007) afirman que durante la senescencia foliar de la hoja bandera de trigo, PEPC genera el oxalacetato necesario para la biosíntesis de aminoácidos y para completar la oxidación de lípidos.

## 2.2 Citocininas

### 2.2.1 Estructura y biosíntesis

Las citocininas (CKs) son derivadas de la adenina y pueden ser clasificadas como isopropenoides o aromáticas, dependiendo de la cadena lateral unida al N6 (Mok y Mok, 2001). En ambos grupos hay pequeñas diferencias en la estructura como: la presencia o ausencia del grupo hidroxilo y la posición estereoisomérica. Las citocininas isopropenoides naturales son:  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenil)-adenina (iP), *trans*-zeatina (tZ), *cis*-zeatina (cZ), y dihidrozeatina (DZ). Las citocininas aromáticas son: *ortho*-topolina (oT), *meta*-topolina (mT), derivados metoxi (meoT y memT) y benciladenina (BA). El contenido de estas en la planta

depende de la especie y de la etapa de desarrollo (Sakakibara, 2006). También se ha logrado sintetizar algunas, por ejemplo, la cinetina y la bencilaminopurina, ambas presentan alta actividad biológica (Borkowska y Jankiewicz, 2003).

Las CKs comparten los mismos sistemas de transporte que las purinas y nucleósidos. Se mueven por difusión y por un sistema selectivo de transportadores. Anteriormente se sabía que sólo se transportaba por el xilema, sin embargo, Sakakibara (2006), señala que pueden utilizar tanto el xilema como el floema. Por ejemplo, la tZR es sintetizada en la raíz y transportada por el xilema a otros órganos de la planta, mientras que la iPR se moviliza por medio del floema (Sakakibara, 2006).

La biosíntesis y homeostasis de las citocininas es controlada por factores externos e internos, por ejemplo, por ABA, etileno y fuentes de nitrógeno inorgánico. Se considera que son sintetizadas principalmente en los ápices de las raíces. Sin embargo, no se puede excluir su síntesis en otros tejidos meristemáticos como el cámbium, las yemas en desarrollo, los frutos jóvenes o semillas en germinación. Además, también se considera que los brotes y las hojas pueden ser lugar de síntesis (Borkowska y Jankiewicz, 2003; Sakakibara, 2006).

El primer paso para la biosíntesis de los isoprenoides es la N-prenilación de la adenosina 5-fosfatos (AMP, ADP o ATP) en el N<sup>6</sup>-terminal con el dimetilalil difosfato (DMAPP) o hidroximetilbutenil difosfato (HMBDP); esta reacción es catalizada por la adenosina fosfato-isopenteniltransferasa (IPT; EC 2.5.1.27). Sin embargo, los sustratos para la biosíntesis de las CKs varían por depender del origen y de la especie (Sakakibara, 2006). En contraste, las vías biosintéticas de las citocininas aromáticas, como el BAP, son completamente desconocidas. Se ha propuesto que utilizan distintas vías de los isoprenoides y que esta relacionada con el metabolismo de fenoles (Mok y Mok, 2001).

### 2.2.2 Función de las citocininas

Las citocininas son reguladores de crecimiento que tienen efectos positivos y negativos en varios aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Estimula la formación y actividad de los meristemos, retardan la senescencia, controlan el crecimiento y la ramificación de las raíces (Borkowska y Jankiewicz. 2003; Riefler *et al.*, 2006). Intervienen en la germinación de las semillas y en la respuesta al estrés. Participan en procesos regulados por la luz, como de-etiolación y diferenciación de los cloroplastos. También regulan la actividad del ciclo celular (Brenner *et al.*, 2005). Las citocininas están involucradas en la respuesta al estatus de nutrientes como los azúcares, nitrógeno, fósforo y sulfato (Franco-Zorrilla *et al.*, 2005). Brenner *et al.* (2005) mencionan que las citocininas están implicadas en el metabolismo y transporte del nitrógeno y carbohidratos, mediante la inducción de ciertas enzimas (nitrato reductasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa e invertasa). Sin embargo, regula pocos genes involucrados en la glicólisis, ciclo de TCA, ciclo de Calvin y fotorespiración.

Se han desarrollado diferentes técnicas para conocer las funciones biológicas de las citocininas, desde las clásicas (aspersión externa) hasta modificaciones genéticas. Con estas últimas técnicas se ha podido conservar la síntesis de CKs, durante la senescencia foliar, a pesar de su disminución natural durante este proceso. Gan y Amasino (1995) fueron los primeros en generar plantas de tabaco transgénicas, que expresan el gene bacterial isopentiltrasferasa (*IPT*), una enzima clave en la biosíntesis de citocininas, bajo control del promotor específico de la senescencia SAG 12 ( $P_{SAG12}$ -*IPT*). Al momento que la senescencia empieza este gen promueve la activación de la producción de citocininas. Se retrasa la senescencia y conduce a la inactivación del SAG12. Las hojas permanecen activas fotosintéticamente por un largo periodo. Se observa también un incremento en el número de

flores y biomasa. Esta documentado que esta modificación se ha podido realizar en diversas especies de plantas como: arroz (*Oryza sativa*), col (*Brassia oleracea*), lechuga (*Lactuca sativa*) (McCabe *et al.*, 2001).

### 2.2.3 Transducción de señales de las citocininas

Las citocininas son percibidas por las histidinas cinasas y la señal se traduce por medio de una cascada de fosforilaciones. La variación estructural de las CKs y las modificaciones de las adeninas le confiere especificidad a la interacción CK-receptor (Sakakibara *et al.*, 2006).

La cascada de señalizaciones esta compuesta por tres módulos: los receptores histidina cinasas (HK), las proteínas fosfotransferasas (HP) y los reguladores respuesta (RR). En *Arabidopsis*, la transducción de la señal involucra diferentes receptores (AHK2, AHK3 y CRE1/AHK4), los cuales después de la unión de la CKs se autofosforilan en los residuos de histidina y el grupo fosforil se envía intramolecularmente a la asparagina, este aminoácido posteriormente es trasferido a la histidina de las proteínas AHP (cinco identificadas en esta especie, AHP1-AHP5). Una vez fosforilada la proteína AHP es transportada al núcleo y cede el fosfato a los residuos de asparagina de los RR (se han identificado más de 22, ARR1-ARR22, divididos en tipo A y tipo B) (Figura 6). Los cuales activan inmediatamente a diferentes genes, por ejemplo, algunos que codifican para los reguladores de crecimiento, expansión de la pared celular, adquisición de nutrientes, metabolismo de nitrógeno y carbono (Brenner *et al.*, 2005; Sakakibara *et al.*, 2006).

Recientemente se ha demostrado que en *Arabidopsis*, la histidina cinasa 3 (AHK3) y el regulador respuesta 2 (ARR2), son esenciales para el control de la senescencia foliar (Figura



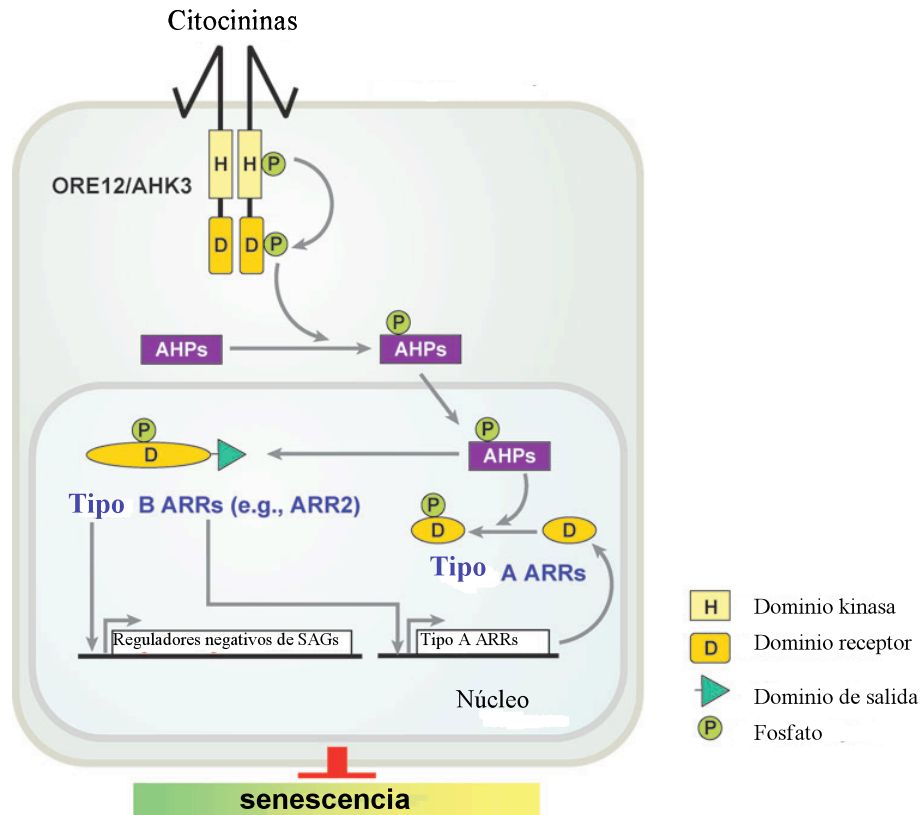
6). Sin embargo, el mecanismo exacto mediante el cual se inducen o reprimen los genes, aun es desconocido (Riefler *et al.*, 2006).

#### 2.2.4 Las citocininas y el retraso de la senescencia

Actualmente existen tres pruebas utilizadas en el estudio del efecto de las citocininas en la senescencia de las plantas: a) la medición de las citocininas endógenas durante la senescencia, b) la aplicación exógena de soluciones de citocininas y c) la biosíntesis regulada de las citocininas en plantas transgenicas ( $P_{SAG12-IPT}$ ). Las citocininas declinan durante la senescencia, sin embargo, la aplicación externa del regulador y la biosíntesis regulada en las plantas  $P_{SAG12-IPT}$  retardan la senescencia (McCabe *et al.*, 2001).

La aplicación externa de citocininas: retrasa la degradación de clorofila, la formación de plastoglobulos y la pérdida de la permeabilidad de la membrana. Además, mantiene los parámetros fotosintéticos, tales como la tasa de asimilación del  $CO_2$  y la eficiencia fotosintética del PS II. Disminuye el incremento de la peroxidación de lípidos, mediante la inducción de enzimas antioxidantes e incrementa la síntesis de carotenoides, los cuales protegen a los centros de reacción del oxígeno y la luz (Vicková *et al.*, 2006; Martínez-Gutierrez *et al.*, 2008).

El efecto de la citocininas en el almidón varía dependiendo de las condiciones en las que se encuentren las plantas. Por ejemplo, fragmentos de hojas de trigo con adición de la citocinina, en oscuridad no acumulan gránulos de este polisacárido; pero si lo hacen con luz. Por el contrario, los fragmentos testigo (sin el regulador de crecimiento), en condiciones de luz no presentaron gránulos (Vicková *et al.*, 2006). La estimulación del almacenamiento de almidón también se observó en plantas de tabaco (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999 b).

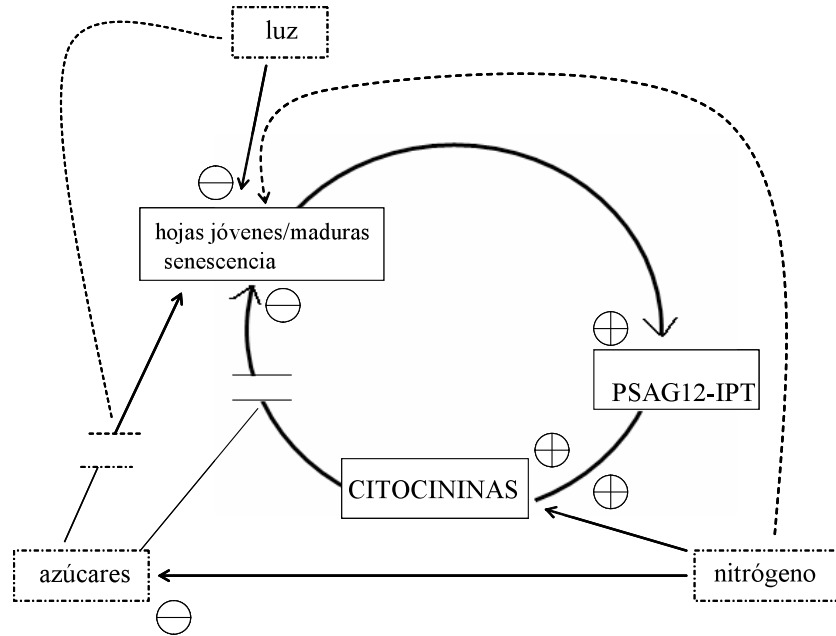


**Figura 6.** Modelo hipotético de la función del ORE12/AHK3 en el control de la senescencia foliar mediado por las citocininas. Aunque la señalización de las citocininas puede percibirse por otros receptores en *Arabidopsis*, ARR2 fosforilado es específicamente mediado por ORE12/AHK3. La fosforilación del ARR2 regulado por las citocininas afecta directamente o indirectamente la inducción de genes responsables del retraso de la senescencia (Lim *et al.*, 2007).

Por otra parte, plantas de tabaco y lechuga transformadas ( $P_{SAG12-IPT}$ ) almacenaron una mayor concentración de glucosa y fructosa que las silvestres (Wingler *et al.*, 1998; McCabe *et al.*, 2001). Jordi *et al.* (2000) afirman que el regulador de crecimiento induce una mayor acumulación de azúcares para superar el retraso de la senescencia. Se demostró que la citocininas poseen la capacidad de regular la repartición de nutrientes y el desarrollo de la planta (Roitsch y Ehneß, 2000).

La relación entre este regulador de crecimiento y el metabolismo primario durante la senescencia se demostró en el estudio realizado por Balbriera-González *et al.* (2004) quienes encontraron que el retraso de la senescencia en plantas de tabaco ( $P_{SAG12-IPT}$ ) esta correlacionado con una mayor actividad de la invertasa extracelular y transportadores de hexosas. Las enzimas se expresan cuando se requieren altas concentración de carbohidratos para los tejidos demanda. Además de proporcionar nutrientes (glucosa y fructosa) que pueden fosforilarse y ser moléculas de señalización (Roitsch *et al.*, 1999).

La senescencia foliar esta regulada por la interacción de diferentes factores como: azúcares, citocininas, nitrógeno y luz (Wingler *et al.*, 1998; Jordi *et al.*, 2000). Los dos primeros presentan un efecto antagónico, es decir, los azúcares inducen la senescencia y las citocininas la retrasan, la acumulación de los azúcares durante este proceso bloquean el efecto de las citocininas (Franco-Zorrilla *et al.*, 2005; Wingler *et al.*, 1998). Por el contrario, este regulador de crecimiento, puede inducir y reprimir la expresión de algunos genes relacionados con el metabolismo y transporte de los carbohidratos. Por ejemplo, la sacarosa sintetasa y algunos transportadores de monosacáridos son inducidos, en contraste, transportadores de sacarosa y la molécula señalizadora hexocinasa (HXK) son reprimidos (Moore *et al.*, 2003; Brenner *et al.*, 2005). La luz también bloquea parcialmente el efecto de los azúcares (Wingler *et al.*, 1998). Por el contrario, existe un efecto positivo entre el nitrógeno y las citocininas (Figura 7) (Sakakibara *et al.*, 2006).



**Figura 7.** Interacción de las citocininas, represión de los azúcares y luz en la regulación de la senescencia con la producción autorregulada del regulador de crecimiento ( $P_{SAG12-IPT}$ ). ⊖, inhibición de la senescencia; ⊕, aceleración de la senescencia; ⊥, bloqueo de los efectos de las citocininas, ⊥, bloque parcial de los efectos de los azúcares (Jordi *et al.*, 2000).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la aspersion externa de la citocinina BAP en las principales macromoléculas (pigmentos fotosintéticos, proteínas solubles y carbohidratos) del metabolismo primario de la segunda hoja de *Triticum aestivum* L, durante la senescencia foliar natural.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar el contenido de los pigmentos fotosintéticos: clorofila *a*, clorofila *b*, carotenos+xantofilas para conocer el efecto de la aspersion externa de BAP en las principales moléculas que intervienen en la fotosíntesis.
- Evaluar la concentración de los compuestos nitrógenados: proteínas solubles totales, aminoácidos totales y Rubisco durante la senescencia natural de las hojas de trigo tratadas con BAP y el testigo (sin BAP).
- Estudiar el efecto de BAP en los carbohidratos: glucosa, fructosa, sacarosa y almidón para conocer los posibles ajustes que al regulador de crecimiento le permiten retrasar la senescencia.
- Analizar la actividad de PEPCK y PEPC durante la senescencia de hojas tratadas y no tratadas con BAP.

#### **4. HIPÓTESIS**

Las citocininas retrasan la senescencia foliar, entonces las macromoléculas y enzimas del metabolismo primario (pigmentos fotosintéticos, proteínas solubles, carbohidratos y Rubisco) permanecerán sin cambios, es decir se conservan en un estado semejante al que presentan las hojas presenescentes (hojas verdes completamente expandidas y con lígula expuesta).

La citocinina BAP conservará un alto porcentaje de compuestos nitrógenados, proteínas solubles y Rubisco, entonces disminuye la formación de compuestos traslocables y por lo tanto se mantendrá baja actividad de PEPCK y PEPC, asociadas al metabolismo de nitrógeno.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Material biológico

Semillas de trigo (*Triticum aestivum* L) cv. Temporalera, proporcionadas por el Dr. Héctor E. Villaseñor Mir del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), fueron sembradas en lotes de 50 semillas en charolas de plástico (33×28×13), a un espacio uniforme entre ellas y a una profundidad de 5 cm, en una mezcla 3:1 de suelo (Peat-moss comercial Cosmocel) y agrolita estéril (Dicalete de México).

Las plantas crecieron en cámaras de cultivo del Colegio de Postgraduados Campus Montecillos, bajo condiciones ambientales controladas: temperatura 23/19 °C (día/noche), fotoperíodo de 13.5 h e intensidad luminosa de 210  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . La fertilización consistió de una solución completa de Steiner (1984), la cual contenía  $\text{KNO}_3$  como fuente de nitrógeno, con la que se realizaron tres aplicaciones con 200, 100 y 50 mL por charola en los días 10, 15 y 22 después de la siembra, respectivamente. Todas las plantas se regaron con agua corriente, cada tercer día.

### 5.2 Tratamiento y muestreo foliar

Para el tratamiento con citocinina se utilizó una solución de 0.1 mM de 6-bencilaminopurina (BAP, Sigma), con 0.02% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) usado para disolver el regulador de crecimiento y 0.02% de Tween 20 (Boehringer Mannheim GmbH) para romper la tensión superficial de la hoja y facilitar la penetración de la solución. La solución testigo consistió de: agua destilada, 0.02% de DMSO y 0.02% de Tween 20 (Martínez-Gutiérrez, 2008).

A los 21 días después de la siembra (DDS), la mayoría de las plantas presentaron la segunda hoja foliar completamente expandida con su lígula expuesta, las plantas que no estuvieron en esta condición se eliminaron para uniformizar el estado de desarrollo en cada charola. De las charolas establecidas, a seis tomadas al azar se les asperjó de forma uniforme a cada charola 350 mL con la solución BAP, y a cada una de otras seis charolas; se les asperjó con 350 mL de la solución testigo, con lo que se cubrió completamente el dosel de las plantas. Las aspersiones se realizaron a las 11:00 h cada tercer día durante 21 días.

Para la toma de muestras, se colectaron 3 cm de la parte media de la segunda hoja foliar, entre las 11:00 y 12:00 am, a los 21, 26, 31, 36 y 46 DDS. Los pigmentos fotosintéticos, proteínas solubles, ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco; EC 4. 1. 1. 39), azúcares, almidón y aminoácidos totales se determinaron en tejidos previamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -40° C. Para determinar la actividad enzimática de fosfoenolpiruvato carboxicinas (PCK-ATP: EC 4.1.1.49) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC: EC 4. 1. 1. 31), y la pérdida de iones, se utilizó tejido fresco. Para cada variable analizada se utilizaron cuatro repeticiones (muestra compuesta de 3 hojas) por tratamiento y se realizó por lo menos dos veces cada experimento.

### 5.3 Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

#### 5.3.1 Unidades SPAD

El contenido de clorofila total durante la senescencia es un marcador que permite conocer aspectos generales de este estado fenológico. Por ello que se determinaron las unidades SPAD en un SPADmeter-502 (Minolta), método no destructivo que determina indirectamente la cantidad de clorofila total. Este instrumento, cuantifica la cantidad relativa



de clorofila total presente en la hoja, mediante la absorbancia en el rojo (400-500nm) y cercano a las regiones del infrarrojo. Para ello se tomo la lectura de 10 hojas por tratamiento de la parte media de la segunda hoja foliar cada cinco días a partir de los 21 DDS hasta el día 41.

### 5.3.2 Cuantificación química de pigmentos

Fragmentos de 150 mg de tejido se maceraron en 4 mL de acetona al 80% (4 °C). El extracto se centrifugó a 840 g durante 10 min. El sobrenadante se recupero y ajustó a 4 mL, para posteriormente medirle la absorbancia a 470 nm, 646 nm y 663 nm en un espectrofotómetro (Evolution 300 UV-Visible). Las concentraciones de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), carotenoides y xantofilas (C+x) se calcularon empleando la formula de Lichtenthaler y Wellburn (1983):

$$\text{Chl}_a = 12.21 A_{663} - 2.81 A_{646}$$

$$\text{Chl}_b = 20.13 A_{646} - 5.03 A_{663}$$

$$\text{C+x} = \frac{1000 A_{470} - 3.27 C_a - 107 C_b}{229}$$

La concentración de pigmentos obtenida en  $\mu\text{g mL}^{-1}$  se relacionó con el peso fresco (PF) de la muestra, para expresarlo en  $\text{mg g}^{-1}$  PF.

### 5.4 Determinación de proteínas solubles totales

Muestras de 150 mg de tejido fresco se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -40 °C. Posteriormente, el tejido se macero con 1 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.5 (1 mM de DTT, 0.1 mM de EDTA y 12.5% de glicerol). El extracto se centrifugó a 15 000 g a 4° C durante 10 min. Se usaron 5  $\mu\text{L}$  del sobrenadante para la

determinación de proteínas y 100  $\mu\text{L}$  para determinar los niveles de la subunidad grande de rubisco (LSU) (Makino *et al.*, 1986).

Las proteínas solubles se cuantificaron en los extractos por el método de Bradford (1976) utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. El ensayo de proteína consistió en mezclar 5  $\mu\text{L}$  de los extractos, 295  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 50  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford (Bio-Rad). Trascorridos 5 min se registró la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas (Multiskan Ascent, Labsystem, marca Thermo), frente a una curva patrón de albúmina (solución stock de:  $0.25 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), la cual se preparo a partir de la solución stock donde se tomaron 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{L}$ , y se aforaron a 300  $\mu\text{L}$  con agua destilada. A continuación se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford para obtener un volumen final de 350  $\mu\text{L}$ . Los  $\mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$  se relacionaron con el peso fresco del tejido para expresarlo en  $\text{mg g}^{-1}\text{PF}$ .

### 5.5 Contenido de la subunidad grande de Rubisco (Rubisco; EC 4. 1. 1. 39)

De la extracción de proteínas solubles se tomo una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  a la cual se le agregó 100  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 50 mM (pH 6.8) que incluye: 1% de SDS, 2% de 2-mercaptoetanol y 12.4% de glicerol, la mezcla se puso a hervir a  $100^{\circ}\text{C}$  por 5 min y se centrífugo por 2 min a 11 000  $g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Las proteínas se separaron mediante electroforesis (SDS-PAGE) de acuerdo con la metodología propuesta por Makino *et al.* (1986). El gel de apilamiento se preparo al 4% (6.1 mL de agua desionizada, 1.3 mL de bis-acrilamida al 30%, 2.5 mL de Tris-HCl 0.5 M a pH 6.8, 0.1 mL de SDS al 10%, 50  $\mu\text{L}$  de APS al 10% y 10  $\mu\text{L}$  de TEMED) y el gel separador al

12% (3.4 mL de agua desionizada, 4 mL de Bis-acrilamida al 30%, 2.5 mL de Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8, 0.1 mL de SDS al 10%, 50  $\mu$ L de APS al 10%, y 10  $\mu$ L de TEMED). Cada carril del gel se cargo con 10  $\mu$ g de proteína, junto con un marcador de pesos moleculares de bajo rango (113, 93, 50, 35, 28 y 21 kDa, Bio-Rad). Este se montó en una cámara vertical de electroforesis (Mini-Potian II Cell, Bio Rad) y se corrió a 20 mA por 1.2 h usando una fuente de poder (Power PAC 3000, Bio Rad).

El gel se fijó en una solución de ácido acético al 7% y metanol al 40% durante 30 min. Posteriormente, para visualizar las bandas, el gel se tiñó con azul de Comassie (CBB-R-250, Sigma) al 0.5% (p/v) que se disolvió en ácido acético glacial al 40% (v/v) y metanol al 60% (v/v), con agitación suave durante 30 min. Finalmente, el gel se destiñó con una solución de ácido acético al 7.5% y 10% de metanol, realizando 3 lavados de 30 min cada uno.

Las bandas de proteína de 55 kDa identificadas como la subunidad grande de Rubisco (LSU), fueron evaluadas en unidades de densidad óptica (UDO) por  $\text{mm}^2$ , con el programa de análisis Quantity One 42.1, Bio Rad, con el objeto de comparar las intensidades relativas de las bandas entre tratamientos.

### 5.6 Aminoácidos totales

Los aminoácidos totales se cuantificaron con los métodos propuestos por Rosen (1957) y Díaz *et al.* (2005). Muestras de 150 mg de tejido fresco se maceraron en 1 mL de ácido sulfosalicílico al 2% (p/v). El producto de la trituración se centrifugó a 10 000 g durante 5 min y el sobrenadante se utilizó para cuantificar estos compuestos nitrogenados.

Al extracto se le adicionó 0.5 mL de solución amortiguadora de acetato de cianidina (360 g  $\text{L}^{-1}$  de acetato de sodio, Baker, y 66 mL de ácido acético glacial aforado a 1 L con agua

destilada) y 0.5 mL de ninidrina al 3% (p/v) (Pierce) disueltos en etilenglicol. Esta mezcla se introdujo en baño de agua a 100 °C durante 20 min. Una vez fríos a los tubos se les añadieron 5 mL de isopropanol al 50%; después de 10 min se procedió a la lectura de las muestras a una longitud de onda de 570 nm en un espectrofotómetro (Evolution 300 UV-Visible, marca Thermo), frente a una curva patrón de glutamina.

Para preparar la curva patrón de glutamina, se pesaron 114.1 mg y se disolvieron en 50 mL de ácido sulfosalicílico al 3%, equivalente a 20  $\mu\text{moles mL}^{-1}$ . De la solución anterior se tomó 1 mL y se llevó a 50 mL con ácido sulfosalicílico al 2%, esta dilución equivale a 400  $\text{nmoles mL}^{-1}$ . De esta última se tomaron 0, 125, 250, 375, 500, 625, 750, 875 y 1000  $\mu\text{L}$  los cuales se aforaron a 1000  $\mu\text{L}$  con ácido sulfosalicílico al 2% para obtener las siguientes concentraciones: 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400  $\text{nmoles}$ . Como blanco se utilizó un volumen equivalente de la solución amortiguadora de 5-ácido sulfosalicílico al 2%. La concentración de aminoácidos se expresó en  $\text{mg g}^{-1}$  PF.

### 5.7 Azúcares solubles y almidón

El proceso de cuantificación de azúcares solubles y almidón se basó en una serie de reacciones enzimáticas secuenciales de la ruta de la glicólisis, donde todos los azúcares solubles se convierten a glucosa 6-fosfato, y el sustrato para la reacción final resulta en la producción de NADH (Scholes *et al.*, 1994). El NADH tiene una absorbancia máxima a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 340 nm que fue la  $\lambda$  a la que se realizaron las lecturas.

### **Azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa)**

Muestras de 200 mg de peso fresco de la parte media de la segunda hoja, se colocaron en frascos con 3 mL de etanol a 80% (v/v) en baño María (70°C) durante 10 min y se recolectó el sobrenadante. En seguida, se agregaron nuevamente a los frascos 3 mL de etanol 80% para repetir el proceso (baño maría a 70 °C por 10 min) y extraer por segunda vez el sobrenadante. Este procedimiento se repitió de 3 a 5 veces en cada muestra, hasta que el tejido se decoloró por completo (blanco). Los sobrenadantes se mezclaron en un solo recipiente para llevarlos a evaporación en una estufa de aire forzado a 50 °C. Los extractos secos se resuspendieron en 1 mL de agua destilada y se mantuvieron a -40 °C hasta la determinación de los azúcares solubles.

Para cada estándar de glucosa, fructosa y sacarosa se hizo una solución stock con 15 mg de cada azúcar que se disolvieron en 6 mL de agua destilada para tener una concentración de 2.5 mg mL<sup>-1</sup>. De esta solución se colocaron 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µL en tubos eppendorf, los cuales se aforaron a 1000 µL con agua destilada. Para obtener las concentraciones de 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 y 250 µg.

Para medir los azucares solubles de cada ensayo se colocaron 200 µL de amortiguador HEPES 100 mM (pH 7.5), 10 µL de NAD 40 mM (Sigma), 10 µL de ATP 100 mM pH 7 (Sigma), 10 µL de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (0.05 U por 1 µL de amortiguador HEPES) (Roche), y 10 µL de la muestra del extracto de cada muestra o 10 µL de la solución de estándares.

Para la determinación de glucosa a cada ensayo se adicionó 10 µL de hexocinasa (0.05 U por 1 µL de amortiguador HEPES) (Roche) y se dejó actuar durante 20 min antes de hacer la lectura a 340 nm. El contenido de fructosa se determinó después de agregarle 10 µL de

fosfoglucoasa isomerasa (0.06 U por 1  $\mu$ L de amortiguador HEPES) (Roche) y 20 min después se tomó la lectura. Finalmente para la determinación de sacarosa se adicionaron 10  $\mu$ L de invertasa (0.8 U por 1  $\mu$ L de amortiguador HEPES) (Sigma) y se dejó 20 min a temperatura ambiente antes de registrar la lectura. Todas las lecturas se registraron en un lector de microplacas (Multiskan Ascent, Labaystem, marca Thermo).

### **Almidón**

El contenido de almidón se cuantificó a través de la medición de la glucosa como sustrato en un lector de microplacas (Multiskan Ascent, Labaystem), a una absorbancia de 340 nm, utilizando glucosa como estándar.

Una vez extraídos los azúcares solubles de las hojas, cada uno de los residuos sólidos se maceraron con nitrógeno líquido y se colectaron en tubos eppendorff, adicionándole 1 mL de agua destilada. Posteriormente, los tubos se colocaron en una autoclave durante 30 min a 121 °C. Para la digestión del almidón se tomo una alícuota de 100  $\mu$ L de la muestra, y se le adicionó 100  $\mu$ L de amortiguador MES 500 mM pH 4.5 (Sigma), 50  $\mu$ L de  $\alpha$ -amilasa (0.5 U de  $\alpha$ -amilasa Sigma por 1  $\mu$ L de amortiguador MES) y 50  $\mu$ L de amiloglucosidasa (0.28 U de amiloglucosidasa por 1  $\mu$ L de amortiguador MES); esta mezcla se incubó durante 4.5 h a 37 °C y después se mantuvo a -40 °C hasta la lectura del almidón.

Para la determinación de almidón se mezclaron 200  $\mu$ L de amortiguador HEPES 100 mM (pH 7.5), 10  $\mu$ L de NAD 40 mM (Sigma), 10  $\mu$ L de ATP 100 mM (pH 7) (Sigma), 10  $\mu$ L de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (0.05 U por 1  $\mu$ L de amortiguador HEPES) (Roche), 10  $\mu$ L del extracto y finalmente se agregó 10  $\mu$ L de hexocinasa (0.05 U por 1  $\mu$ L de

amortiguador HEPES), la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 20 min antes de registrar la lectura.

### 5.8 Actividad enzimática de fosfoenolpiruvato carboxicinas (PCK-ATP: EC 4. 1. 1. 49)

Se homogeneizaron 200 mg de material vegetal fresco en 0.5 mL de buffer de extracción (Bicina-KOH 200 mM, DTT 50 mM, pH 9.0) a 4 °C. El producto de la trituración se recibió en tubos sumergidos en hielo e inmediatamente se centrifugó a 10 000 g por 10 min, el sobrenadante se utilizó para la determinación de la actividad enzimática.

La mezcla de reacción contenía: solución amortiguadora Hepes-KOH 100 mM (pH 6.8), 100 mM de KCl (Merck), 0.1 mM de NADH (Sigma), 6 mM de MnCl<sub>2</sub> (Merck), 6 mM de PEP (Sigma), 1 mM de ADP (Sigma), 90 mM de KHCO<sub>3</sub> (Sigma) y 6 U mL<sup>-1</sup> de MDH (Sigma) y 30 µL de extracto enzimático. Los cambios en absorbancia se registraron durante un período de 3 min en un espectrofotómetro (Evolution 300 UV-Visible, marca Thermo). El volumen total de la reacción fue de 150 µL (Walker *et al.*, 1995; Delgado-Alvarado *et al.*, 2007).

Una unidad de actividad de PEPCK corresponde a la producción de 1 µmol min<sup>-1</sup> de oxalacetato a 25°C. La actividad se calculó con la siguiente formula:

$$\mu\text{moles de OAA min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{PF} = \frac{(\Delta A) (VE) (VTE)}{6.22 (t) (v) (g)}$$

Donde:

**ΔA:** Incremento de absorbancia con la enzima menos el incremento con ADP

**VE:** Volumen de extracción (mL)

**VTE:** Volumen total del ensayo (mL)

**t:** Intervalo de tiempo (min)

**v:** Alícuota del extracto en el ensayo (mL)

**g:** Gramos de tejido fresco

**6.22:** Coeficiente de extinción del NADH

### 5.9 Actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC: EC 4. 1. 1. 31)

La actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) se midió con una adaptación de los métodos descritos por Uedan y Sugiyama (1976) y Aguilar-Becerril y Peña Valdivia (2006). En este estudio se midió la actividad de la enzima *in vitro*, en presencia de fosfoenolpiruvato (PEP) y ácido carbónico ( $\text{HCO}_3$ ) como sustratos.

La enzima se extrajo a partir de 200 mg de tejido que se homogenizó con 1 mL de 100 mM de Tris-HCl (pH 7.8) y 12 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol a 4°C. El producto de la trituración se recibió en tubos sumergidos en hielo e inmediatamente se centrifugó a 10 000 g durante 10 min, utilizando el sobrenadante para la determinación de la actividad enzimática.

La actividad de PEPC se cuantificó espectrofotométricamente en una reacción acoplada a la enzima málico dehidrogenasa (MDH), mediante la desaparición de la nicotinamina adenina dinucleótido reducido (NADH) a una longitud de onda de 340 nm. El medio de reacción y el orden en que se agregaron los reactivos fue: 975 mL de la solución amortiguadora (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0), 20 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Merck), 5 mM de  $\text{NaHCO}_3$  (Baker), 5 U  $\text{mL}^{-1}$  de MDH (Sigma), 0.5 mM de NADH (Sigma), 3 mM de PEP (Sigma) y 30  $\mu\text{L}$  de extracto crudo. Adicionalmente, se preparó un blanco que consistió en la omisión del extracto enzimático en el ensayo, y el volumen correspondiente fue sustituido por la solución



amortiguadora de Tris-HCl (100 mM) pH 7.8. El volumen total de cada ensayo fue de 1.5 mL y la lectura se tomó cada 20 segundos durante 3 min.

La actividad se calculó en forma indirecta, con la cuantificación del consumo de NADH, mediante la siguiente ecuación:

$$\mu\text{moles de NADH oxidados min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{PF} = \frac{(\Delta A) (VE) (VTE)}{6.22 (t) (v) (g)}$$

Donde:

**ΔA:** Incremento de absorbancia

**VE:** Volumen de extracción (mL)

**VTE:** Volumen total del ensayo (mL)

**t:** Intervalo de tiempo (min)

**v:** Alícuota del extracto en el ensayo (mL)

**g:** Gramos de tejido fresco

**6.22:** Coeficiente de extinción del NADH

### 5.10 Medición de la pérdida de electrolitos

La integridad relativa de la membrana plasmática se determinó como el porcentaje de la pérdida de electrolitos, descrito por Prásil y Zámecník (1998) y Sánchez-Urdaneta *et al.* (2004). Se pesaron 100 mg de hojas en peso fresco que fueron cortados en segmentos de 0.5 cm de largo y lavados en agua desionizada (HDI). Estos segmentos se colocaron en tubos de vidrios que contenían 5 mL de HDI. Posteriormente los tubos se incubaron en baño de agua a 30 °C por 2 h. La primera lectura (C1) de conductividad eléctrica ( $\mu\text{S/cm}$ ) del medio de resuspensión se determinó a las 2 h, en un conductímetro (Horiba b-173, Kyoto, Japón).

Posteriormente, las muestras se almacenaron en un ultracongelador a  $-40^{\circ}\text{C}$  por 12 h para liberar todos los electrolitos de los cuales se tomó la segunda lectura (C2), en la misma solución. La pérdida de electrolitos se calculó en porcentaje de la siguiente manera:

$$\% \text{ de la pérdida de electrolitos} = (C1/C2) (100)$$

### 5.11 Diseño experimental

Se utilizó el diseño completamente al azar (las charolas de las plantas asperjadas con BAP y el testigo se distribuyeron en forma totalmente aleatoria). Se aplicó este diseño debido a que las unidades experimentales eran completamente homogéneas (sustrato y condiciones ambientales). No se utilizó el diseño experimental de bloques al azar por que no se trabajó con gradientes o fuentes de variación (Montgomery, 2004).

El modelo estadístico del diseño experimental completamente al azar fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

**$Y_{ij}$** : variable respuesta

**$i$** : tratamiento

**$j$** : repetición

**$\epsilon_{ij}$** : error experimental

**$\mu$** : media

**$T_i$** : efecto del tratamiento

En la cámara de cultivo se distribuyeron al azar 12 charolas, de éstas seis charolas se trataron con la solución que contenía el regulador de crecimiento BAP y seis con solución testigo (agua). A los 21 DDS se realizó el muestreo foliar como se explicó anteriormente.

### **5.12 Análisis estadístico**

A cada conjunto de datos, por ejemplo, los valores de contenido de clorofila total del testigo y el tratamiento con BAP se les aplicó la prueba de normalidad (Bondad y ajuste;  $\chi^2$ ) y de varianzas homogéneas (Bartlett). Las variables que presentaron una distribución normal y varianzas homogéneas fueron: clorofila total, proteínas solubles totales, clorofila *a*, clorofila *b*, aminoácidos, Rubisco, glucosa, fructosa, sacarosa y la pérdida de electrolitos (Cuadro 1A y 2A, ver Anexos). A estos datos se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de diferencia significativa honesta (Tukey) (Cuadro 3A y 4A, ver Anexos). Por el contrario, a las unidades SPAD, xantofilas + carotenoides, almidón, PEPC y PEPCK (Cuadro 5A), se les realizó el análisis con estadística no paramétrica (Kruskal-Wallis). Debido a que los datos carecieron de las condiciones para aplicar estadística paramétrica. El paquete estadístico que se utilizó fue STATGRAPHICS Plus 4 y SAS 9.1.

## 6. RESULTADOS

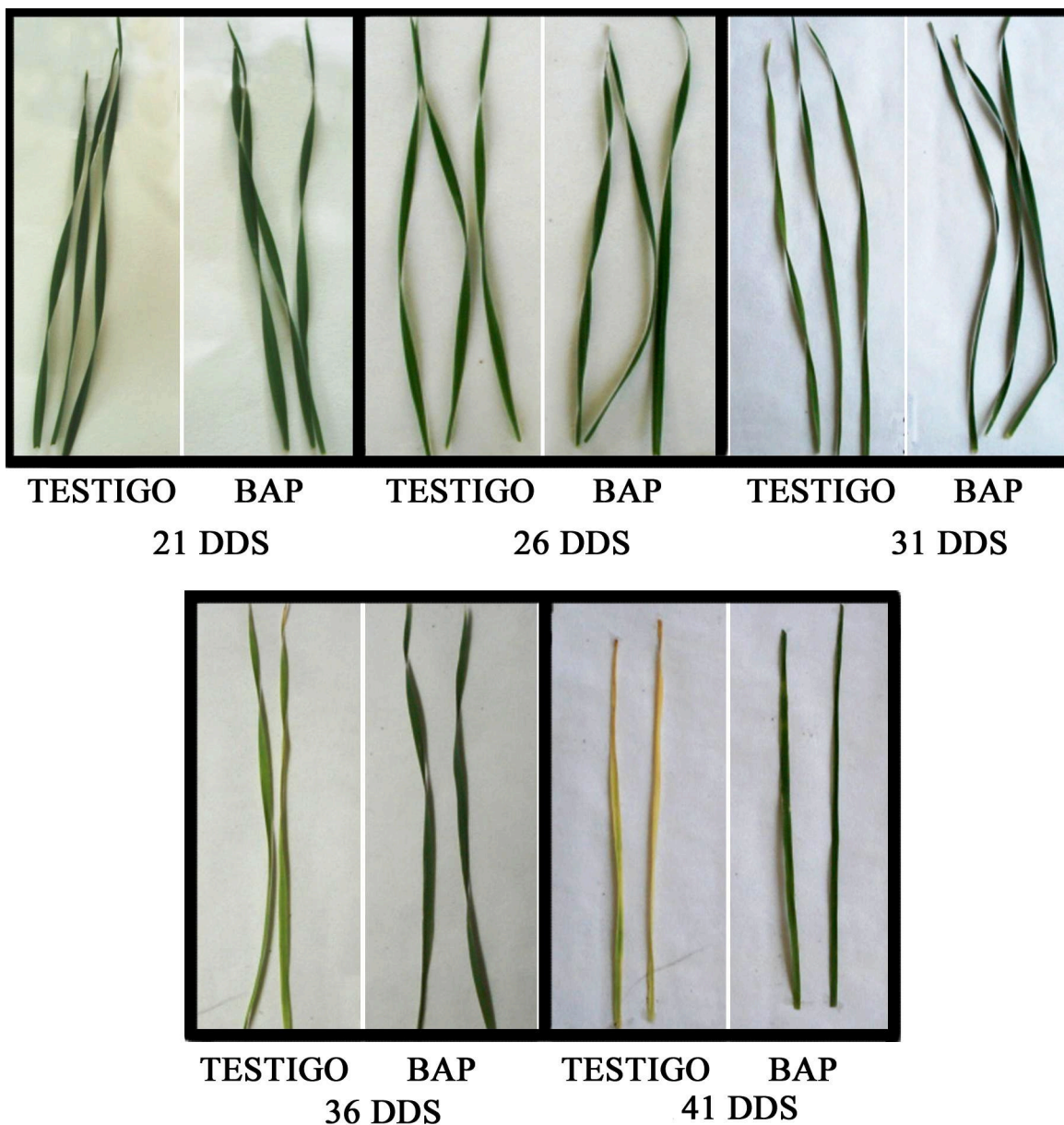
En este estudio se observó que la aspersión de la citocinina BAP (0.1 mM) retrasó la senescencia foliar de la segunda hoja de *Triticum aestivum* L cv. Temporalera, en comparación con el testigo (aspersión de agua). El testigo perdió gradualmente sus pigmentos fotosintéticos tornándose las hojas completamente amarillas (el cambio de color es el síntoma visible de la senescencia) a los 41 DDS; en contraste, las hojas tratadas con las citocinina conservaron el color verde en éste mismo día, lo cual visualmente indica el retraso de degradación de la clorofila (Figura 8).

### 6.1 Unidades SPAD

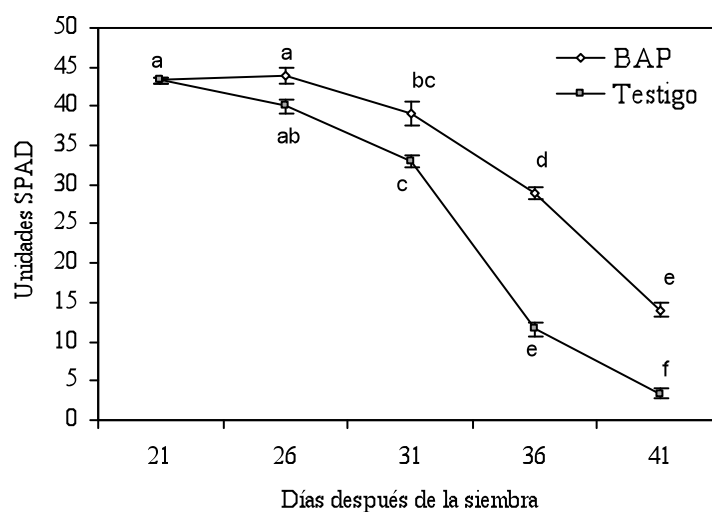
La determinación de unidades SPAD involucra un método no destructivo para cuantificar indirectamente el contenido de clorofila total, lo cual en el presente estudio permitió monitorear el amarillamiento foliar bajo el tratamiento con BAP. Los valores SPAD registrados en los fragmentos de hojas variaron en un intervalo entre 2.5 y 45 unidades SPAD, este intervalo permitió abarcar las diferentes tonalidades de verde durante la senescencia foliar.

Durante la senescencia se presentó una pérdida gradual de las unidades SPAD. A partir de los 36 DDS se presentaron diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre el testigo y las hojas tratadas con la citocinina (Cuadro 5A, ver anexo). En el testigo el cambio más significativo ocurrió entre los 31 y 36 DDS, como se observa en la figura 9. En este intervalo de tiempo, el testigo presentó un decremento de 37% en las unidades SPAD, mientras que las hojas tratadas con el regulador de crecimiento sólo perdieron 22%. A los 41 DDS, las hojas

tratadas con BAP conservaron en promedio  $14 \pm 3$  unidades SPAD, mientras que el testigo  $4 \pm 2$  unidades SPAD (Figura 9).



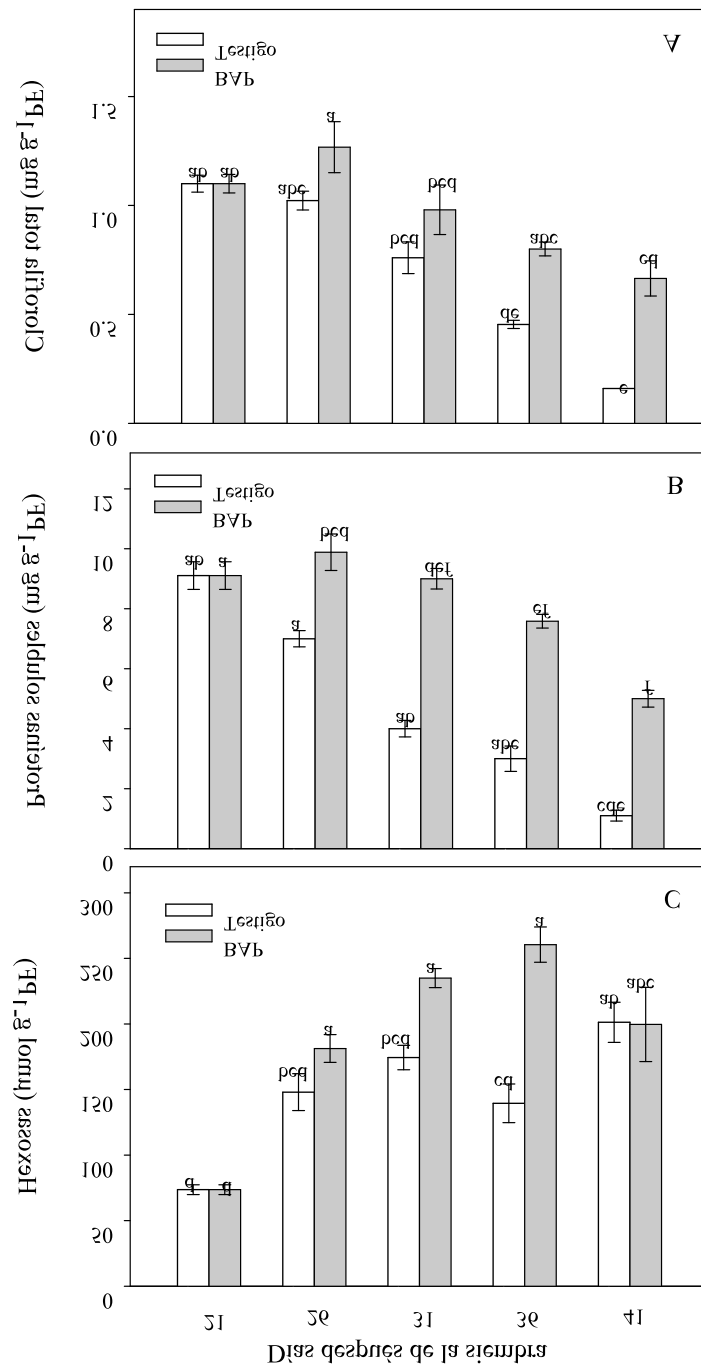
**Figura 8.** Retraso de la senescencia y retención del color verde de la segunda hoja de trigo durante la senescencia (21 a los 41 DDS) por tratamiento con BAP (0.1 mM).



**Figura 9.** Unidades SPAD de la segunda hoja foliar de trigo asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua), durante la senescencia foliar natural. Los datos son promedios  $\pm$  E.S.,  $n = 8$ , medias con diferente letra en los días después de la siembra son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

### 6.2 Degradación de macromoléculas del metabolismo primario (clorofila total, proteínas solubles totales y hexosas) durante la senescencia natural

Los cambios fenotípicos inducidos por la aspersión de la citocinina, se reflejaron en el retraso de la degradación de las principales macromoléculas del metabolismo primario. En las figuras 10A y 10B se observa la degradación paralela de la clorofila total y proteínas solubles en el testigo; mientras que en las asperjadas con BAP se presentó un incremento no significativo de éstos compuestos a los 26 DDS, posteriormente su contenido disminuyó, pero con valores más altos que el testigo durante todo el proceso de senescencia, con diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$  Cuadro 3A, ver anexo). En la última fase de la senescencia (41 DDS) las citocininas permitieron conservar 60% de clorofila total y 44% de proteínas solubles totales, mientras que el testigo perdió prácticamente éstos compuestos (Figura 10A).



**Figura 10.** Concentración de clorofila total (A), proteínas solubles (B) y hexosas (C) durante la senescencia natural de la segunda hoja de trigo, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua). Los datos son promedios  $\pm$  E.S. ( $n = 4$ ), medias con diferente letra en los días después de la siembra son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

En relación con el contenido de carbohidratos en la figura 10C se observa que en ambos tratamientos se acumularon hexosas (glucosa+fructosa). Estos azúcares alcanzaron el máximo nivel cuando el contenido de pigmentos fotosintéticos y proteínas disminuyeron significativamente. Sin embargo, la aspersión externa de BAP modificó la tendencia en la acumulación de azúcares durante la senescencia, en comparación con el testigo. Las plantas que no fueron tratadas con el regulador de crecimiento incrementaron su contenido hasta los 31 DDS. Posteriormente, disminuyeron su concentración a los 36 DDS y finalmente presentaron un incremento estadísticamente no significativo a los 41 DDS. Sin embargo, las citocininas presentaron una mayor acumulación ( $P \leq 0.05$ ) que el testigo a los 31 y 36 DDS (Cuadro 3A, ver anexo).

### 6.3 Pigmentos fotosintéticos

#### **Clorofila *a***

EL BAP promovió el retraso de la degradación de la clorofila *a* (Chl *a*), en comparación con el testigo. Las hojas asperjadas con el regulador de crecimiento incrementaron su contenido en el día 26; por el contrario, el testigo mantuvo 83% de Chl *a*, respecto a los 21 DDS. En el día 36, las hojas tratadas con BAP presentaron 68% de Chl *a*, mientras que el testigo sólo 34%. En día 41, el testigo presentó 7% de clorofila *a*, en contraste, las asperjadas con BAP conservaron 57% (Cuadro 1). Las diferencias estadísticas significativas entre el testigo y el tratamiento con BAP se observaron a los 26, 36 y 41 DDS (Cuadro 3A, ver anexo).



**Clorofila *b***

La tendencia en la degradación de clorofila *b* (Chl *b*) fue diferente entre el testigo y el tratamiento con BAP. Las hojas testigo mantuvieron en promedio  $0.23 \pm 0.02$  mg g<sup>-1</sup>PF hasta los 31 DDS. Por el contrario, las hojas tratadas con BAP presentaron un incremento en el día 26, posteriormente la concentración disminuyó gradualmente. Sin embargo, en el día 41, las hojas asperjadas con el regulador de crecimiento mantuvieron 69% ( $0.16 \pm 0.01$  mg g<sup>-1</sup>PF) y el testigo 29% ( $0.06 \pm 0.02$  mg g<sup>-1</sup>PF) (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Contenido de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides+xantofilas durante la senescencia natural de la segunda hoja de trigo, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua).

DDS <sup>¶</sup>	Chl <i>a</i> (mg g <sup>-1</sup> PF)		Chl <i>b</i> (mg g <sup>-1</sup> PF)		C+x (mg g <sup>-1</sup> PF)	
	Testigo	BAP	Testigo	BAP	Testigo	BAP
21	0.87±0.0 <sup>ab</sup>	0.87±0.03 <sup>ab</sup>	0.23±0.01 <sup>ab</sup>	0.23±0.01 <sup>ab</sup>	0.34±0.02 <sup>ab</sup>	0.34±0.02 <sup>ab</sup>
26	0.73±0.09 <sup>bc</sup>	0.97±0.09 <sup>a</sup>	0.25±0.06 <sup>abc</sup>	0.29±0.01 <sup>a</sup>	0.27±0.00 <sup>b</sup>	0.42±0.04 <sup>a</sup>
31	0.52±0.06 <sup>cd</sup>	0.76±0.10 <sup>bcd</sup>	0.23±0.03 <sup>ab</sup>	0.22±0.01 <sup>bc</sup>	0.29±0.02 <sup>ab</sup>	0.33±0.02 <sup>ab</sup>
36	0.30±0.12 <sup>de</sup>	0.60±0.02 <sup>abc</sup>	0.15±0.02 <sup>cd</sup>	0.19±0.00 <sup>ab</sup>	0.23±0.02 <sup>ab</sup>	0.30±0.02 <sup>ab</sup>
41	0.09±0.01 <sup>e</sup>	0.50±0.07 <sup>cd</sup>	0.06±0.02 <sup>d</sup>	0.16±0.01 <sup>bc</sup>	0.04±0.02 <sup>c</sup>	0.29±0.04 <sup>ab</sup>

<sup>¶</sup>DDS: días después de la siembra. Los datos son promedios ± E.S., n=4, medias con diferente letra en los días después de la siembra son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

**Pigmentos accesorios (carotenoides +xantofilas)**

Otros pigmentos fotosintéticos, que cambiaron la secuencia de los procesos catabólicos, como consecuencia de la aspersión externa de BAP son los carotenoides +xantofilas (C+ x). Por ejemplo, el contenido de estos pigmentos en las hojas que no fueron tratadas con BAP mostraron un decremento gradual durante la senescencia natural; mientras

que las hojas asperjadas con BAP aumentaron su concentración estadísticamente significativa en el día 26, con respecto al testigo. Posteriormente, el tratamiento con BAP mantuvo los niveles sin cambios acentuados, en promedio  $0.30 \pm 0.01 \text{ mg g}^{-1}\text{PF}$  (Cuadro 1). En la fase terminal el testigo sólo conservó 12%, mientras que el tratamiento con BAP mantuvo 85% de los pigmentos accesorios. Las diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ ) se presentaron a los 26 y 41 DDS (Cuadro 3A, ver anexo).

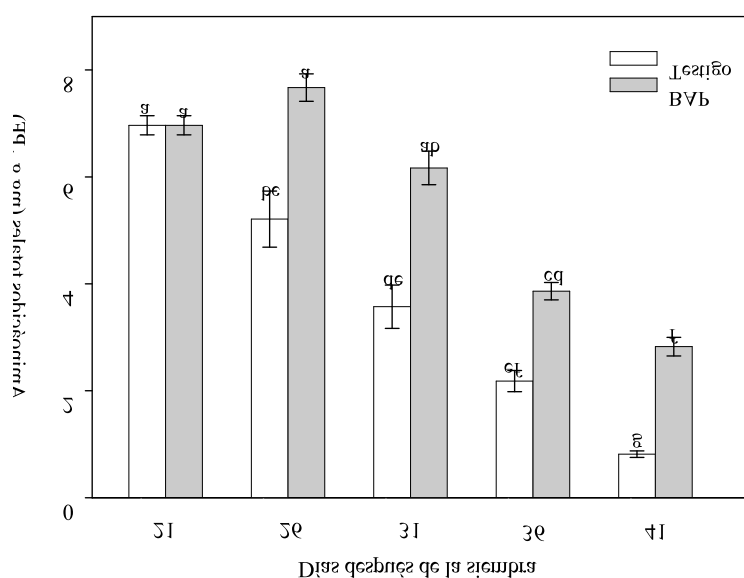
Por lo tanto, la citocinina BAP retrasó la degradación e indujo un incremento de los pigmentos fotosintéticos y accesorios durante la senescencia foliar de trigo. La disminución en la razón  $\text{Chl } a:\text{Chl } b$  en las hojas senescentes sugiere que la  $\text{Chl } a$  es más afectada que la  $\text{Chl } b$  (la proporción disminuyó de 3.7 a 1.3). Por el contrario, las hojas tratadas con BAP mantuvieron una proporción de 3.7 a 3.0, lo cual indica que durante el retraso de la degradación de pigmentos el BAP mantuvo la proporción de  $\text{chl } a$  y  $\text{chl } b$  similar a la hoja verde (Cuadro 2). La relación de  $\text{Chl total}:\text{C}+\text{x}$  disminuyó durante la senescencia, lo cual indica una mayor degradación de la clorofila total que de los pigmentos accesorios. El testigo disminuyó su proporción de los 21 a los 41 DDS de 3.2 a 0.32 evidencia del amarillamiento de la lámina, mientras que las hojas asperjadas con BAP tuvieron un cambio menos pronunciado de 3.2 a 2.2, esto significa que se mantuvieron verdes (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Razón clorofila *a*:clorofila *b* y clorofila total: carotenoides + xantofilas en la segunda hoja de trigo durante la senescencia natural, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua).

Días después de la siembra	<u>Razón</u> Chl <i>a</i> :Chl <i>b</i>		<u>Razón</u> Chl total:C+x	
	Testigo	BAP	Testigo	BAP
21	3.7	3.7	3.2	3.2
26	2.5	3.4	3.6	2.9
31	2.2	3.2	2.5	2.9
36	1.9	3.1	1.9	2.6
41	1.3	3.0	0.3	2.2

#### 6.4 Aminoácidos totales

El contenido de aminoácidos totales disminuyó gradualmente durante la senescencia en el testigo, pero en las asperjadas con la citocinina se presentó un incremento a los 26 DDS, posteriormente también declinó su concentración. A partir del día 26 se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 3A, ver anexo). En el día 31, las hojas testigo perdieron 50% mientras que las tratadas con BAP sólo 12%. En la última fase de la senescencia (41 DDS), las hojas tratadas con la citocinina presentaron un mayor contenido de aminoácidos ( $2.83 \pm 0.12 \text{ mg g}^{-1}\text{PF}$ ) que el testigo ( $0.82 \pm 0.35 \text{ mg g}^{-1}\text{PF}$ ), lo que representó 40% y 6% del contenido de aminoácidos respectivamente respecto a las hojas presenescentes (día 21) (Figura 11).

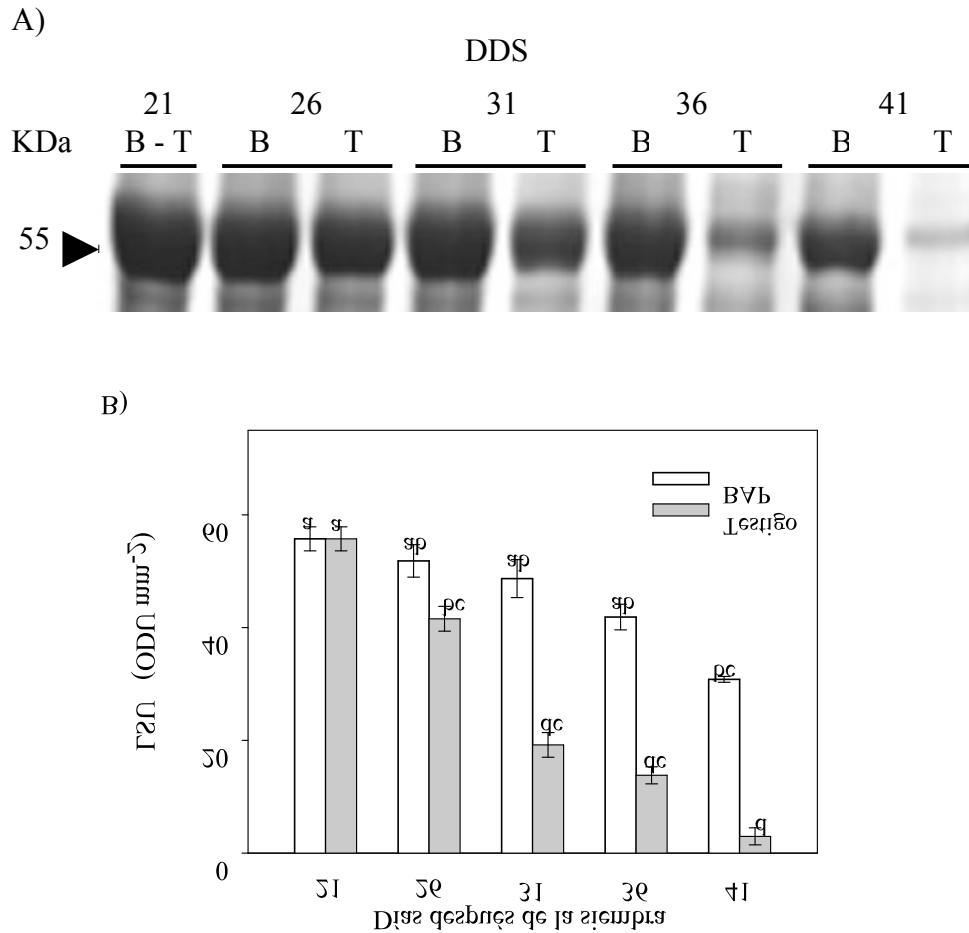


**Figura 11.** Contenido de aminoácidos totales en la segunda hoja de trigo, asperjadas con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua). Los datos son promedios  $\pm$  E.S.,  $n=4$ , medias con diferente letra en los días después de la siembra son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

### 6.5 Subunidad grande (LSU) de Rubisco

Aunque durante la senescencia hay una degradación gradual de la subunidad grande de Rubisco, las hojas asperjadas con BAP, conservaron por más tiempo esta parte de la proteína que el testigo, lo anterior se visualiza en los geles de SDS-PAGE, donde se muestra la subunidad grande (LSU) de Rubisco con un peso molecular de 55 kDa (Figura 12A). El contenido de LSU se cuantificó mediante unidades de densidad óptica por  $\text{mm}^2$  ( $\text{ODU mm}^{-2}$ ). De acuerdo a las ODU se encontraron diferencias estadísticas significativas respecto al testigo ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 4A, ver anexo). En el día 26 las hojas testigo perdieron 26% del contenido inicial de LSU; por el contrario, las hojas tratadas con BAP sólo perdieron 7%. Cinco días después (31 DDS) las hojas sin BAP tuvieron menos del 50%, mientras que las hojas tratadas con el regulador de crecimiento conservaron 80% de LSU. Los cambios más notorios se

observan a los 41 DDS, en donde el testigo conservó 5% del contenido inicial de LSU y las tratadas con la citocinina retuvieron 50% (Figura 12 B).



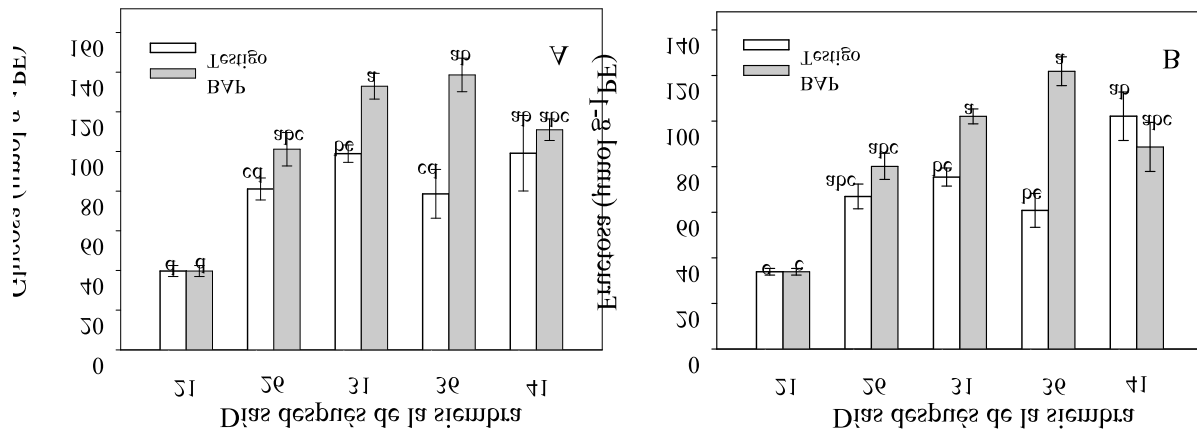
**Figura 12.** Contenido de la subunidad grande (LSU) de Rubisco. A) Perfil electroforético en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de la segunda hoja de trigo tratada con BAP (B) y solución testigo (T), DDS (días después de la siembra). Las cargas en el gel corresponden a 15  $\mu$ g de proteína. B) Cuantificación del contenido de LSU por análisis densitométrico (ODU mm<sup>-2</sup>). Los datos son promedios  $\pm$  E.S., n = 4, medias con diferente letra en los días después de la siembra son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

## 6.6 Azúcares solubles

### Glucosa, fructosa y sacarosa

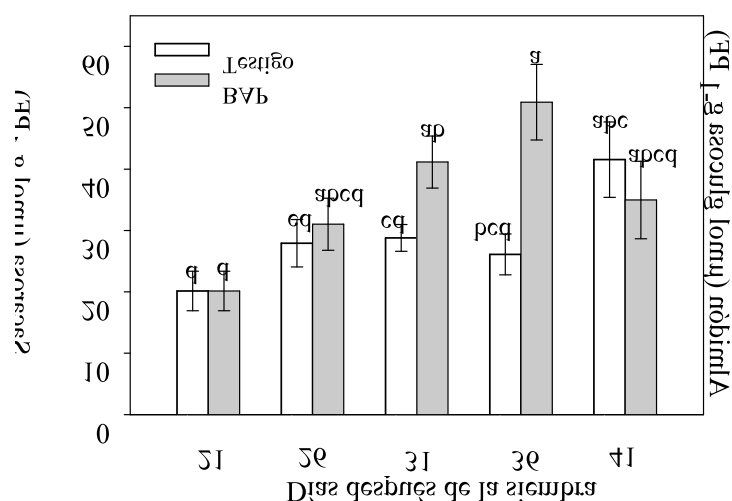
Existe una acumulación de glucosa durante la senescencia foliar natural de la segunda hoja de trigo. Particularmente, en el día 21 el testigo tuvo en promedio  $39.70 \pm 4.80 \mu\text{mol g}^{-1}\text{PF}$  de glucosa, y en los días posteriores el contenido de glucosa incrementó hasta  $99.13 \pm 38 \mu\text{mol g}^{-1}\text{PF}$ , en el día 41, observándose una ligera disminución en el contenido de este azúcar a los 36 DDS. La tendencia fue similar en las hojas tratadas con BAP, aunque con contenidos mayores de glucosa que el testigo (Figura 13A), mostrando los contenidos mayores entre los días 31 y 36, con diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 4A, ver anexo).

El contenido de fructosa también se incrementó en las hojas senescentes de trigo de manera similar al comportamiento de glucosa. Durante la fase de iniciación de la senescencia (21 DDS), el testigo presentó en promedio  $33.90 \pm 2.40 \mu\text{mol g}^{-1}\text{PF}$ , posteriormente en el día 31, el contenido fue de  $60.80 \pm 6.90 \mu\text{mol g}^{-1}\text{PF}$ . En el día 36, la concentración de esta hexosa disminuyó ( $60.90 \pm 14.50 \mu\text{mol g}^{-1}\text{PF}$ ). Las hojas asperjadas con el regulador de crecimiento BAP también incrementaron el contenido de este monosacárido desde  $33.90 \pm 2.40 \mu\text{mol g}^{-1}\text{PF}$  a  $121.90 \pm 12.30 \mu\text{mol g}^{-1}\text{PF}$ , en el día 21 y 36 respectivamente (Figura 13B). Las diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos se presentaron a los 31 y 36 DDS (Cuadro 4A).



**Figura 13.** Contenido de hexosas: A) glucosa y B) fructosa durante la senescencia natural de la segunda hoja foliar de trigo asperjada con la citocinina BAP (0.1 mM) y la solución testigo (agua). Los datos son promedios  $\pm$  E.S.,  $n=4$ , medias con diferente letra en los días después de la siembra son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

El contenido de sacarosa también se incrementó durante la senescencia foliar natural de trigo; pero en cantidades menores que las hexosas. En el día 26, el testigo y el tratamiento con BAP, no presentaron diferencias estadísticas significativas ( $P \geq 0.05$ ), en el contenido de este carbohidrato; pero en el día 31, el testigo presentó una menor concentración que el tratamiento con BAP,  $28.80 \pm 4.20 \mu\text{mol g}^{-1}\text{PF}$  y  $41.15 \pm 8.20 \mu\text{mol g}^{-1}\text{PF}$  respectivamente (Figura 14). Para el día 41, las hojas tratadas con el regulador de crecimiento presentaron una menor concentración que el testigo; pero sin diferencias estadísticas significativas ( $P \geq 0.05$ ), (Cuadro 4A).

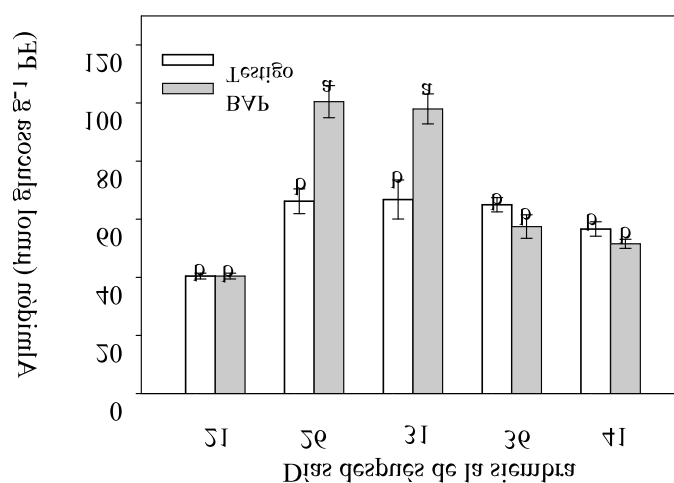


**Figura 14.** Contenido de sacarosa durante la senescencia natural de la segunda hoja foliar de trigo asperjada con la citocinina BAP (0.1 mM) y la solución testigo (agua). Los datos son promedios  $\pm$  E.S.,  $n=4$ , medias con diferente letra en los días después de la siembra son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

### 6.7 Almidón

Durante la senescencia natural de la segunda hoja foliar de trigo, a los 26 DDS se observó un incremento en el contenido de almidón en las hojas testigo ( $66.20 \pm 8.20 \mu\text{mol glucosa g}^{-1}\text{PF}$ ), en comparación con el día 21 ( $40.40 \pm 2.00 \mu\text{mol glucosa g}^{-1}\text{PF}$ ). Posteriormente, los niveles de almidón se mantienen constantes desde los 26 hasta los 36 DDS. Por el contrario, en las plantas asperjadas con la citocinina BAP, el contenido de almidón se incrementó en más de 50% del día 21 al 31 ( $40.40 \pm 2.00$  a  $97.90 \pm 10.00 \mu\text{mol glucosa g}^{-1}\text{PF}$ ) respectivamente, mostrando en estas fechas diferencias estadísticas significativas entre las hojas testigo y las asperjadas con BAP ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 15). En el día 41, ambos tratamientos disminuyeron su concentración, sin diferencias estadísticas significativas ( $P \geq 0.05$ ) (Cuadro 5A).

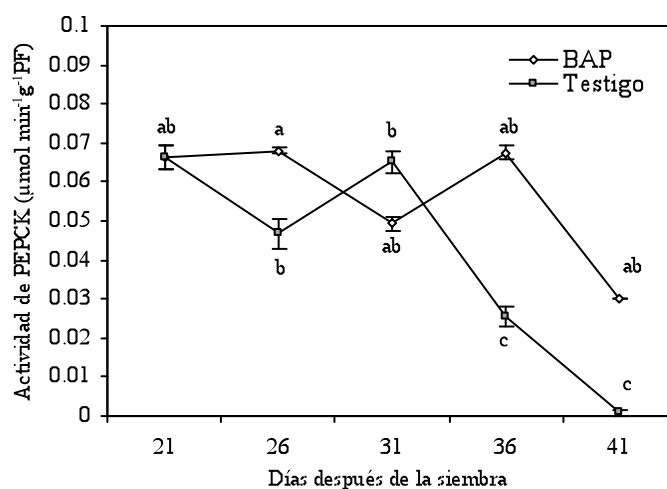




**Figura 15.** Contenido de almidón durante la senescencia natural de la segunda hoja foliar de trigo asperjada con la citocinina BAP (0.1 mM) y la solución testigo (agua). Los datos son promedios  $\pm$  E.S.,  $n=4$ , medias con diferente letra en los días después de la siembra son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

### 6.8 Actividad de fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK)

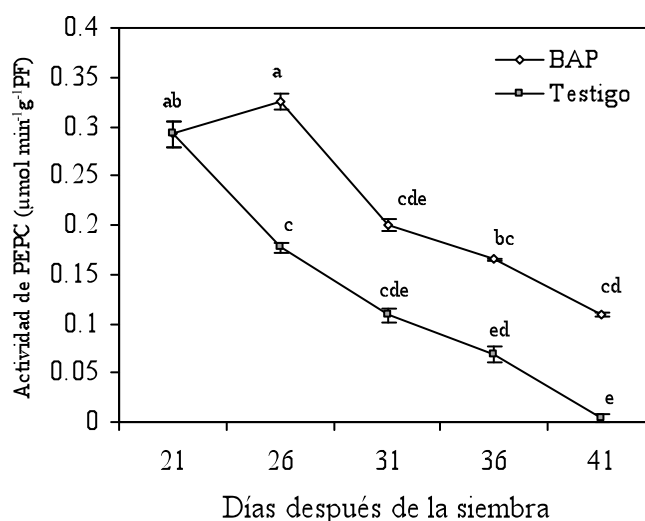
Existe una interacción en la tendencia de la actividad enzimática de PEPCK, entre las hojas testigo y las tratadas con la citocinina BAP a través de la senescencia natural de la segunda hoja foliar de trigo, con diferencias estadísticas significativas a partir del día 26 ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 5A, ver anexo). En esta fecha, las hojas con BAP presentaron en promedio una actividad de  $0.070 \pm 0.012 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{PF}$ . A los 31 DDS, la actividad con BAP disminuyó ( $0.050 \pm 0.003 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{PF}$ ), mientras que el testigo presentó un incremento estadísticamente no significativo ( $0.068 \pm 0.014 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{PF}$ ). A los 41 DDS, las hojas asperjadas con BAP conservaron 55% de su actividad, mientras que el testigo sólo mantuvo 1%, respecto al día 21 (Figura 16).



**Figura 16.** Actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCK), durante la senescencia foliar natural de la segunda hoja de trigo, asperjada con la citocinina BAP (0.1 mM) y la solución testigo (agua). Los datos son promedios  $\pm$  E.S.,  $n=4$ , medias con diferente letra en los días después de la siembra son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

### 6.9 Actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)

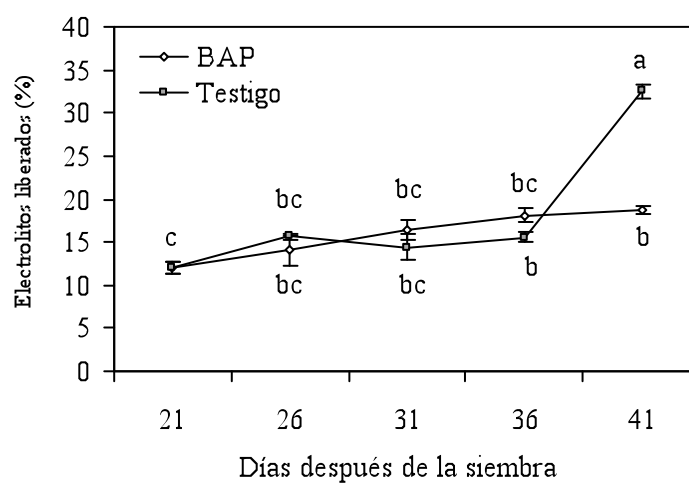
Durante la senescencia natural de la segunda hoja foliar de trigo se observan diferencias estadísticas significativas en la actividad enzimática de PEPC, entre el testigo y el tratamiento con BAP ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 5A, ver anexo). A los 26 DDS, en las hojas testigo se encontró una disminución gradual de la actividad, mientras que en las hojas tratadas con el regulador de crecimiento se apreció un incremento en la actividad de la enzima. Para el día 31, el testigo perdió más del 50% de actividad, mientras que en las hojas asperjadas con BAP sólo disminuyó 31%. En el día 41 las hojas asperjadas con la citocinina mantuvieron una mayor actividad ( $0.109 \pm 0.01 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$ ) que el testigo, ( $0.004 \pm 0.005 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PF}$ ), lo cual en porcentaje representa 37% y 1% respectivamente, con respecto al día 21 (Figura 17).



**Figura 17.** Actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) durante la senescencia foliar natural de la segunda hoja de trigo, asperjada con la citocinina BAP (0.1 mM) y la solución testigo (agua). Los datos son promedios  $\pm$  E.S.,  $n=4$ , medias con diferente letra en los días después de la siembra son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

### 6.10 Médiación de la pérdida de electrolitos

La desintegración de las membranas fue evaluada de manera indirecta por la liberación de electrolitos de la membrana plasmática. Los tejidos senescentes del testigo mostraron un incremento gradual en la liberación de electrolitos. En la última fase de la senescencia (41 DDS) la liberación de electrolitos aumentó significativamente de 15% a 32%, indicando la desintegración de membranas. En contraste, las hojas tratadas con BAP mantuvieron un bajo porcentaje en la liberación de electrolitos (12 a 18%) del día 21 al 41 respectivamente, lo cual hace evidente la función de protección de la citocininas contra el daño de membranas en hojas de trigo senescentes (Figura 18). Esto se soporta con el análisis estadístico de los datos, donde sólo se encontraron diferencias estadísticas significativas en el día 41 ( $P \leq 0.05$ ), (Cuadro 4A, ver anexo).



**Figura 18.** Porcentaje de la liberación de electrólitos en la segunda hoja foliar de trigo, durante 41 días después de la siembra. En plantas tratadas con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua). Los datos son promedios  $\pm$  E.S.,  $n=3$ , medias con diferente letra en los días después de la siembra son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

## 7. DISCUSIÓN

Las citocininas constituyen un elemento interno que regula la senescencia foliar. Durante éste proceso el regulador de crecimiento disminuye su concentración, sin embargo la aspersión externa o la síntesis interna mediante modificaciones genéticas (expresión de la enzima isopentenil fosfotransferasa, *IPT*), retrasa la senescencia en varias especies de plantas (tabaco, lechuga, maíz) (Wingler *et al.*, 1998; McCabe *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2007). El mecanismo exacto por el cual las citocininas inducen y reprimen la expresión de genes para éste efecto aún se desconoce. No obstante, en un estudio realizado en arabidopsis se demostró que los receptores histidina cinasa 3 (*AHK3*) y el regulador respuesta 2 (*ARR2*) son activados por las citocininas para controlar la senescencia de las hojas (Riefler *et al.*, 2006).

Jordi *et al.* (2000) demostraron que plantas de tabaco transgénicas (*P<sub>SAG12-IPT</sub>*) retrasaron la degradación de clorofila, proteínas solubles y enzimas fotosintéticas (Rubisco). Además, mantuvieron la fijación de CO<sub>2</sub> por más tiempo y se originó una mayor acumulación de carbohidratos, principalmente de hexosas (Wingler *et al.*, 1998). Una respuesta similar originó la aspersión externa de BAP en el presente estudio. La segunda hoja foliar de trigo tratada con el regulador de crecimiento retrasó la degradación de macromoléculas del metabolismo primario, en comparación con el testigo. Las citocininas inhibieron la degradación de pigmentos fotosintéticos. En el día 41 DDS, el testigo presentó una coloración completamente amarilla (en promedio  $4 \pm 2$  unidades SPAD) y las asperjadas con el regulador de crecimiento conservaron una tonalidad verde-amarilla ( $14 \pm 3$  unidades SPAD). La disminución en los contenidos de clorofila y proteínas totales fue paralela en ambos tratamientos, pero las hojas tratadas con la citocinina mantuvieron un alto porcentaje de éstos compuestos (con diferencias estadísticas significativas) durante el proceso de senescencia. El

BAP indujo una mayor acumulación de hexosas (glucosa+fructosa) que el testigo a los 31 y 36 DDS.

Un biomarcador frecuentemente usado para establecer el inicio de la senescencia es la pérdida de clorofila asociada con la degradación de los cloroplastos (Zimmermann y Zentgraf, 2005). El nitrógeno de las moléculas de los pigmentos fotosintéticos no es transportado a los órganos demanda; sin embargo, se requiere la degradación gradual y ordenada para evitar la generación de metabolitos tóxicos para la célula (Hörtensteiner y Feller, 2002). Las citocininas tienen un efecto traduccional y postraduccional en el núcleo y en el cloroplasto. Se demostró que éstos reguladores de crecimiento mantienen la síntesis de proteínas (codifican para la síntesis de la subunidad pequeña de Rubisco e incrementan la actividad de aminoacil-ARNt sintetasa), regulan la fosforilación ribosomal y la actividad de los ARNt (Benková *et al.*, 1999; Wingler *et al.*, 2004). Además, retrasan la degradación de pigmentos fotosintéticos, inducen la actividad de enzimas de la biosíntesis de clorofila (sintetasa ácida  $\delta$ -aminolevulinico) (Huynh *et al.*, 2005) y promueven la síntesis de pigmentos accesorios (Vlcková *et al.*, 2006).

Los cloroplastos perciben rápidamente las señales de las citocininas o las descifran directamente. Por ejemplo, se sabe que en plántulas de *Arabidopsis*, 15 min después del tratamiento con BAP, 71 genes fueron inducidos y 11 suprimidos. De éstos, cinco reguladores transccripcionales estuvieron ligados al plastidio: *petA* (codifica para el citocromo *f*), *PsbG* (expresa la proteína G del fotosistema II), *cf10* (involucrado en la eficiente utilización del carbono inorgánico dentro del cloroplasto), *cf5* (interviene en la biogénesis del citocromo *c*) y *matK* (codifica el factor de corte y enpalme del ARN). En el presente estudio se presentaron diferencias estadísticas en el contenido de clorofila total entre las hojas tratadas con BAP y el

testigo ( $P \leq 0.05$ ). Las hojas tratadas con BAP mantuvieron un alto porcentaje de pigmentos fotosintéticos durante todo el proceso de senescencia, la diferencia más notable se observó a los 41 DDS. En ésta fecha el testigo perdió prácticamente toda la clorofila total, mientras que la aspersión de la citocinina, permitió conservar 60%, respecto a las hojas presenescentes (21 DDS). A este respecto, Jordi *et al.* (2000) observaron que en plantas de tabaco con la producción autorregulada de citocininas ( $P_{SAG12-IPT}$ ) retuvieron 100% de estos pigmentos fotosintéticos, en comparación con las hojas jóvenes. Incluso, en fragmentos de hojas de catarantus (*Catharanthus roseus*), incubadas durante 10 días en BAP (0.4 mM) incrementaron su contenido de pigmentos hasta el día 6, posteriormente disminuyeron gradualmente.

La tasa de degradación de los diferentes tipos de pigmentos fotosintéticos varía dependiendo de la especie y de las condiciones de crecimiento de las plantas. La disminución (de 3.7 a 1.3) en la razón Chl *a*:Chl *b* en las hojas testigo sugiere que la Chl *a* es más afectada que la Chl *b*. Por el contrario, las hojas tratadas con BAP mantuvieron valores de 3.7 a 3.0, lo cual indica que durante el retraso de la degradación de pigmentos el BAP mantuvo la proporción de chl *a* y chl *b* similar a la hoja verde. Una respuesta similar fue reportada por Martínez-Gutierrez (2008) en plantas de trigo que crecieron en invernadero y por Palaván-Ünsal *et al.* (2002) en la senescencia inducida en fragmentos de hojas de esta misma especie. En contraste, Lu *et al.* (2005) observaron una mayor degradación de clorofila *b*, durante la senescencia natural de hojas de trigo que crecieron en parcelas. En falso trigo o cizaña (*Lolium temulentum* L), en girasol (*Helianthus annuus*), en maíz (*Zea mays*) y cebada (*Hordeum vulgare*) hay una preferencial degradación de clorofila *a* (Gay y Thomas 1995; Kolodziejek *et al.*, 2003; Cabello *et al.*, 2006). Sin embargo, Thomas *et al.* (2002) encontraron que la clorofila *b* es menos estable que la clorofila *a*. Diferentes autores señalan que el

contenido de Chl *a* es más afectado que la Chl *b*, debido a que la vía catabólica es específica para la Chl *a*, y la Chl *b* debe ser convertida a Chl *a* antes de entrar a la vía de degradación (Cabello *et al.*, 2006; Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007). Además, Sato *et al.* (2007) señalan que la degradación de Chl *b* requiere del gene siempre verde, SGR (gen siempre verde), que tiene una regulación traduccional y postraduccional durante el catabolismo de éste pigmento. Por el contrario, los SGR sólo mantienen una regulación postraduccional en la degradación de Chl *a*.

Durante la senescencia foliar natural los pigmentos accesorios se degradan más lentamente que los pigmentos fotosintéticos. En algunas especies incrementan su contenido de manera natural (cebada y maíz) (Kolodziejek *et al.*, 2003), sin embargo, otras mantienen los mismos niveles (cizaña o falso trigo) (Gay y Thomas, 1995). Se sabe que las citocininas incrementan la síntesis de pigmentos accesorios para proteger a los centros de reacción de la luz y oxígeno (Wingler *et al.*, 2004; Vlcková *et al.*, 2006). En este estudio se encontró que la citocinina BAP indujo un incremento de C+x hasta los 26 DDS, posteriormente los valores se mantuvieron constantes, pero significativamente más altos que el testigo. Una tendencia similar fue reportada por Zavaleta-Mancera *et al.* (2007) en fragmentos de hojas de trigo incubados en BAP por 6 días en oscuridad. Por el contrario, Martínez-Gutierrez *et al.* (2008) en condiciones de invernadero con iluminación natural observaron un aumento de C+x durante la senescencia natural de la segunda hoja foliar de trigo. En ésta misma especie Lu *et al.* (2001) encontraron un incremento de pigmentos accesorios (violaxantina, anteroxantina, zeaxantina y luteína) en altas intensidades de luz.

La remobilización de nitrógeno, potasio, fósforo y otros nutrientes requiere la coordinación de las vías de degradación de los pigmentos fotosintéticos, proteínas tilacoidales y proteínas solubles (Hörtensteiner y Feller, 2002; Winlger *et al.*, 2004). La movilización de



las proteínas de los cloroplastos es la actividad metabólica central en la senescencia foliar. Thomas *et al.* (2002) observaron una correlación significativa entre la clorofila y proteínas de membranas, que con proteínas solubles. Por ejemplo, la degradación de LHC II, depende de la desintegración de la clorofila *b* (Sato *et al.*, 2007) y la degradación de LHCP II también es dependiente de la degradación de clorofila (Thomas *et al.* 2002). Sin embargo, el catabolismo de las proteínas del estroma es totalmente independiente (por ejemplo, Rubisco y glutámico semialdehído aminotrasferasa, GSAAT). Pero, si se modifica la degradación de clorofila mediante mutaciones genéticas, se reduce la regresión lineal (Thomas *et al.*, 2002). A este respecto, Jordi *et al.*, (2000) demostraron que plantas transgénicas de tabaco ( $P_{SAG12-IPT}$ ) mantienen un alto porcentaje de clorofila (100%) en las hojas senescentes, pero la biosíntesis autorregulada de citocininas es menos efectiva en conservar los niveles de proteínas (30%). Aún así la biosíntesis autoregulada de citocininas durante la senescencia foliar tiene importantes efectos en la translocación de  $N_2$  a los órganos en desarrollo. Sin embargo, Pospíšilová *et al.* (2000) afirman que la citocinina BAP estimula la síntesis de aminoácidos. En el presente estudio la disminución de proteínas en el testigo disminuyó significativamente a partir de los 26 DDS, mientras que la disminución de clorofila fue más gradual. Por el contrario, el tratamiento con BAP presentó un incremento estadísticamente no significativo en éste día tanto en el contenido de clorofila como en el de proteína. Las citocininas mantuvieron una mayor concentración de los compuestos nitrogenados (proteínas y aminoácidos) que el testigo durante todo el proceso de senescencia con diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ ), por ejemplo, a los 41 DDS el tratamiento con BAP mantuvo  $2.83 \pm 0.12 \text{ mg g}^{-1}\text{PF}$  y el testigo  $0.82 \pm 0.35 \text{ mg g}^{-1}\text{PF}$  de aminoácidos totales. En plantas de tabaco ( $P_{SAG12-IPT}$ ) Jordi *et al.* (2000) observaron que se conservan mejor los niveles de proteínas

solubles (30%) que de Rubisco (15%) en las hojas senescentes. Por el contrario, en el presente estudio las hojas asperjadas con BAP conservaron un porcentaje ligeramente mayor de LSU de Rubisco (50%) que de proteínas solubles (44%) a los 41 DDS.

Rubisco es una de las enzimas más importantes durante la senescencia por poseer más del 50% del N<sub>2</sub> translocable a los órganos demanda (Masclaux *et al.*, 2001). Chiba *et al.* (2003) encontraron que durante la senescencia natural en hojas de trigo la degradación de Rubisco empieza a disminuir rápidamente, mientras que la clorofila y LHC II permanecen por más tiempo sin cambios significativos. Por su parte, Parrot *et al.* (2007) demostraron que la acumulación de carbohidratos está correlacionada con el incremento de la degradación de proteínas solubles (Rubisco) y proteínas de la membrana (proteínas clorofílicas cosechadoras de luz, LHCP). Lo anterior se debe a que los azúcares inducen la senescencia mediante la expresión de algunos genes SAGs (descarboxilasas, epimerasas y cinasas). En particular el aumento de la actividad de la aminopetidasa, cnd41, la cual está correlacionada con la disminución del contenido de Rubisco. En *Arabidopsis* y tabaco el incremento de azúcares origina la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de nitrógeno, GS1 y GDH (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2005; Pourtau *et al.*, 2006). Aunado a esto el aumento de la concentración de carbohidratos disminuye la fotosíntesis, por medio de la inmovilización del fósforo inorgánico (Pi), lo cual limita la capacidad de regeneración de Rubisco en hojas de trigo, por la disminución de ATP, esencial para el funcionamiento de rubisco activasa que activa esta enzima fijadora de CO<sub>2</sub>. También, en el citósol de las células del mesófilo, la hexocinasa genera una cascada de señalizaciones, que reprime la expresión de genes fotosintéticos (Sharma-Natu y Ghildiyal, 2005). Sin embargo, en los pétalos la respuesta es contraria a la de las hojas. La senescencia es inducida por la falta de azúcares y se retrasa

mediante la aplicación de ellos. Además, de estas discrepancias entre órganos, se desconoce el origen, a pesar de existir disminución de la tasa fotosintética durante la senescencia foliar (Lee *et al.*, 2004); y también se desconoce en que compartimentos celulares se localizan los azúcares (Pourtau *et al.*, 2006; Wingler *et al.*, 2006). Algunos autores como Wingler *et al.* (1998) lo atribuyen al rompimiento de almidón o a la exportación preferencial de N<sub>2</sub>. Por su parte, Jongebloed *et al.* (2004) mencionan que se debe al bloqueo del floema por la deposición de calosa. Por lo tanto, la relación exacta entre los carbohidratos y la senescencia no está clara y depende de la combinación de los factores externos como la luz, concentración de CO<sub>2</sub>, de la aplicación de N<sub>2</sub> a la planta, infecciones de patógenos y estrés (Wingler *et al.*, 2006).

En un estudio realizado por Parrot *et al.* (2007) indican que el bloqueo del floema en hojas de cebada (*Hordeum vulgare*) ocasionó una mayor acumulación de carbohidratos que el testigo. A los 8 días se alcanzaron los niveles máximos de azúcares y justo en este día Rubisco y LHCP disminuyeron significativamente su concentración. En unidades densitométricas de Rubisco, las hojas con el floema bloqueado tuvieron una disminución de 34%, mientras que en el testigo la disminución fue de 60-80%. En el presente estudio, la inducción de la senescencia por parte de los carbohidratos no es tan evidente en el testigo. Los niveles mayores de azúcares se observaron a los 31 DDS, mientras que los niveles de Rubisco disminuyeron significativamente cinco días antes (26 DDS), respecto a las hojas presenescentes (día 21 DDS). Por el contrario, en las hojas tratadas con BAP a los 36 DDS se alcanzó la máxima concentración de azúcares y en esta fecha la enzima fijadora de CO<sub>2</sub> disminuyó significativamente (25%) comparado con las hojas presenescentes.

El incremento de carbohidratos durante la senescencia foliar natural puede ocurrir en cualquier fase, dependiendo de la especie y la etapa de desarrollo de la planta. En tabaco los

azúcares se acumulan en la fase de iniciación y disminuyen en la fase terminal (Masclaux *et al.*, 2000). Por el contrario, en higuera (*Ricinus communis*) y en girasol (*Helianthus annuus*) alcanzaron sus máximos niveles en la última fase de la senescencia (Jongebloed *et al.*, 2004; Cabello *et al.*, 2006). En *Arabidopsis*, los azúcares empezaron a incrementar cuando los signos de senescencia fueron visibles (amarillamiento foliar) y alcanzan sus máximos niveles en las hojas completamente senescentes (Pourtau *et al.*, 2004, 2006). En este estudio, el testigo alcanzó los niveles máximos de hexosas (glucosa y fructosa) a los 31 DDS, cuando las hojas presentaban los primeros signos de senescencia (amarillamiento foliar). Sin embargo, en el día 36 presentaron una disminución significativa en el contenido de hexosas y de pigmentos fotosintéticos (66%). Finalmente, en el día 41 el testigo perdió todos sus pigmentos fotosintéticos, pero mantuvo altas concentraciones de hexosas. En contraste, las hojas asperjadas con BAP alcanzaron su nivel máximo de glucosa y fructosa a los 36 DDS, lo cual coincidió con la disminución significativa de las unidades SPAD (30%) y de la concentración de clorofila total, respecto a las hojas presenescentes

En relación con la sacarosa, principal carbohidrato translocable a los órganos en desarrollo, en plantas de tabaco y *Arabidopsis* disminuye gradualmente durante la senescencia (Masclaux *et al.*, 2000; Pourtau *et al.*, 2006). Sin embargo, alteraciones en el estatus de nutrición alteran la respuesta y originan acumulaciones de éste disacárido (Pourtau *et al.*, 2004). Por el contrario, en higuera Jongebloed *et al.* (2004) observaron una acumulación de sacarosa durante la senescencia natural. En el presente trabajo el testigo mantuvo concentraciones constantes de sacarosa de los 26 a los 36 DDS, posteriormente tuvo un incremento no significativo. Las hojas asperjadas con BAP, mostraron una acumulación de sacarosa de los 21 a los 36 DDS, posteriormente los niveles disminuyeron significativamente.

Respecto al almidón, en algunas especies disminuye durante la senescencia, pero en otras se acumula. Por ejemplo, en plantas de tabaco y *arabidopsis* los niveles de este polisacárido disminuyen (Masclaux *et al.*, 2000; Diaz *et al.*, 2005). En contraste, en *Cucumis sativus* L. Schaffer *et al.* (1991) encontraron que durante la senescencia foliar, los contenidos de almidón se incrementan, las hojas verdes presentaron  $268 \mu\text{g cm}^{-2}$  y las hojas amarillas o senescentes  $2,216 \mu\text{g cm}^{-2}$ . De forma similar en *Ricinus communis* L. se observó un aumento principalmente durante la última fase de la senescencia (Jongebloed *et al.*, 2004). En el presente estudio, el testigo mantuvo contenidos similares de almidón de los 26 a los 36 DDS (en promedio  $65.90 \pm 1.00 \mu\text{mol glucosa g}^{-1}\text{PF}$ ), en contraste, las hojas asperjadas con BAP, incrementaron significativamente su contenido hasta el día 31, posteriormente los niveles disminuyeron marcadamente.

Los resultados del trabajo muestran que la aspersión externa de BAP modificó la tendencia de acumulación de los azúcares solubles y del almidón durante la senescencia foliar natural de la segunda hoja de trigo, en comparación con el testigo. No obstante, que la acumulación de carbohidratos induce la senescencia, las hojas tratadas con la citocinina presentaron una mayor acumulación de éstos compuestos. A este respecto Wingler *et al.* (1998) y Jordi *et al.* (2000) señalan que el incremento de los azúcares se requiere para superar el retraso de la senescencia en plantas transgénicas de tabaco (*P<sub>SAG12</sub>-IPT*). Además, se sabe que las citocininas originan cambios en toda la planta, lo cual les permite retrasar la senescencia foliar mediante diferentes mecanismos. Guivarc'h *et al.* (2005) mencionan que las citocininas regulan la expresión de genes implicados en la repartición de asimilados y en la regulación de la fuente-demanda. Por ejemplo, induce la expresión de la invertasa y transportadores de hexosas, incrementa la utilización de los hidratos de carbono para impedir el

inicio de los procesos catabólicos, por lo que aumenta la actividad de la invertasa extracelular (Balibrera-Lara *et al.*, 2004). Roitsch y Ehneß (2000) demostraron que las citocininas incrementan la fuerza de la demanda (la capacidad de un órgano o tejido para descargar carbohidratos del floema). Éstos reguladores de crecimiento contribuyen al aumento en el tamaño de los tejidos demanda por la inducción de la división celular, por medio de la señalización de azúcares. Además, el incremento de la actividad de la invertasa extracelular proporciona un mecanismo de amplificación y mantenimiento de las señales de las citocininas (Balibrera-Lara *et al.*, 2004).

El incremento en la concentración de las hexosas por la aspersión o modificación genética es regulada por la morfología de la planta y la etapa de desarrollo (McCabe *et al.*, 2001). En plantas de tabaco ( $P_{SAG12-IPT}$ ) las hojas senescentes y maduras presentaron una mayor acumulación de hexosas que las silvestres (Wingler *et al.*, 1998). Por el contrario, en lechuga ( $P_{SAG12-IPT}$ ) las hojas jóvenes y maduras mostraron una mayor concentración que las silvestres, pero en las hojas senescentes no se observaron diferencias entre ambas (McCabe *et al.*, 2001). En el presente estudio se encontró que sólo a los 31 y 36 DDS, las plantas asperjadas con BAP presentaron una mayor concentración de glucosa y fructosa respecto al testigo con diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ). Las diferencias pueden atribuirse a que el regulador de crecimiento induce la expresión de conjuntos diferentes de genes dependiendo de la especie (McCabe *et al.*, 2001).

En diferentes especies de plantas con el gen *IPT*, como en tabaco y lechuga, se modifica la distribución de los asimilados (Guivarc'h *et al.*, 2005). Por ejemplo: en plantas de tabaco ( $P_{SAG12-IPT}$ ) Wingler *et al.* (1998) observaron que las hojas transgénicas senescentes presentaban una menor concentración de sacarosa que las silvestres, pero las hojas jóvenes y

maduras no presentaron diferencias en el contenido de éste disacárido. Por el contrario, plantas de lechuga modificadas ( $P_{SAG12-IPT}$ ) presentaron un mayor contenido de sacarosa en las hojas jóvenes, maduras y senescentes a los 123 DDS que las silvestres. Antes de esa fecha las concentraciones fueron similares entre ambas (McCabe *et al.*, 2001). De igual forma en plantas de arabis con senescencia retardada presentaron una disminución gradual de sacarosa durante la senescencia foliar; pero con una concentración mayor que las plantas con senescencia natural (Diaz *et al.*, 2005). En el presente estudio, el tratamiento con BAP indujo una mayor acumulación de sacarosa a los 31 y 36 DDS respecto al testigo con diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ ). En la última fase de la senescencia (41 DDS), las hojas asperjadas con la citocinina presentaron una menor concentración de éste disacárido que el testigo; pero sin diferencias estadísticas significativas ( $P \geq 0.05$ ).

Por otra parte, la biosíntesis endógena de citocininas mediante la introducción del gen *IPT* o la incubación de fragmentos de hojas en éstos reguladores de crecimiento originan una mayor acumulación de almidón. Vlcková *et al.* (2006) observaron que fragmentos de hojas de trigo incubados en [N<sup>6</sup>-(meta-hidroxibenzil) adenina] y luz presentaron un incremento en el contenido de almidón, mientras que en el tratamiento en oscuridad no fueron detectados gránulos de este polisacárido, lo cual se atribuyó a que los fragmentos estuvieron aislados del resto de la planta. Sin embargo, en plantas de tabaco con modificaciones internas en la producción de citocininas ( $P_{SAG12-IPT}$ ), las hojas vegetativas completamente expandidas presentaron más del 60% de almidón que las silvestres, es decir las hojas sin modificaciones genéticas (Guivarc'h *et al.*, 2005). En el presente trabajo las hojas asperjadas con BAP presentaron una acumulación de almidón hasta los 31 DDS, posteriormente los contenidos

disminuyeron significativamente. Las diferencias estadísticas entre el testigo y el tratamiento con la citocinina se presentaron a los 26 y 31 DDS.

Todos los procesos catabólicos descritos anteriormente cuyo propósito es la translocación de los nutrientes requieren energía, sin embargo, durante la senescencia, la fotosíntesis disminuye significativamente y por ende la generación de ATP. Es por ello que las hojas utilizan algunos sustratos producto de la degradación de las diferentes macromoléculas para producir energía. La ruta biosintética empleada difiere dependiendo de las condiciones del estudio (senescencia natural o inducida) y de la especie (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). En fragmentos de hojas incubados en oscuridad, debido a la falta de carbohidratos, se metabolizan los ácidos grasos de las membranas a acetyl coenzima A (CoA) por la  $\beta$ -oxidación dentro de los glioxisomas, formando acetyl-CoA, el cual puede ser usado para producir energía que mantiene los procesos de senescencia o puede ser convertido a oxalacetato y llevar a cabo la gluconeogénesis para la producción de sacarosa (Hopkins *et al.*, 2007). Por el contrario, el incremento en el contenido de hexosas (glucosa y fructosa) durante la senescencia natural, no requiere la síntesis de más carbohidratos por lo tanto no se lleva a cabo la gluconeogénesis. En *Arabidopsis*, los genes para enzimas del ciclo del glioxilato (isocitrato liasa y malato sintetasa) no son inducidos. El acetyl-CoA liberado de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos es respirado directamente. Sin embargo, las hojas senescentes de pepino si presentan enzimas del ciclo del glioxilato y la fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK) (Buchanan-Wollaston *et al.*, 1997, 2005). Se sabe que algunas de las funciones principales de PEPCK están relacionadas con la descarboxilación del oxalacetato dentro de un subgrupo de las plantas  $C_4$  y su intervención en la gluconeogénesis durante la germinación de semillas. Sin embargo, en años recientes se ha encontrado a esta enzima, PEPCK, en diferentes tejidos de plantas, incluyendo el subgrupo de



las NADP-ME de las plantas C<sub>4</sub>, frutos, tricomas, conductos de resina, raíces, semillas en desarrollo, en el haz vascular y en hojas de plantas C<sub>3</sub> (Walker *et al.*, 2001; Leegood y Walker, 2003). Chen *et al.* (2000) señalan que PEPC se encuentra presente en hojas senescentes de pepino (C<sub>3</sub>), distribuida principalmente en el floema y en los tricomas. La asociación de PEPC al haz vascular, en esta especie, sugiere que esta involucrada en el transporte de aminoácidos, regulación del pH y que presenta una función cataplérotica para regular la presencia de oxalacetato en el ciclo TCA durante la síntesis de aminoácidos. La presencia de la enzima en los tricomas esta relacionada con el metabolismo de nitrógeno, debido a que se libera NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de la ruta de Shikimato; aunque durante la senescencia foliar natural e inducida de cebada (planta C<sub>3</sub>) no estuvo presente. Sin embargo, Buchanan-Wollaston *et al.* (2005) mencionan que PEPC, PEPC y el ciclo TCA, están involucrados en la síntesis de glutamina, principal aminoácido transportable en la senescencia foliar natural.

En este trabajo se encontró actividad de PEPC durante la senescencia foliar natural de las hojas de trigo en el testigo y en las asperjadas con BAP. Se observó una interacción en la tendencia entre ambas. En el día 41, las hojas asperjadas con BAP conservaron 55% de su actividad, en contraste el testigo sólo mantuvo 1%, respecto al día 21. En otras especies de plantas C<sub>3</sub>, también se ha detectado la actividad de PEPC, por ejemplo, en hojas de pepino la actividad fue de  $0.140 \pm 0.11$  U g<sup>-1</sup>PF, en tabaco de  $0.030 \pm 0.01$  U g<sup>-1</sup>PF mientras que en cebada no estuvo presente (Walker *et al.*, 1999).

Otra enzima que ha sido poco estudiada durante la senescencia es fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC). Buchanan-Wollaston *et al.* (2005) afirman que interviene en la biosíntesis de los aminoácidos para la translocación. Gregersen y Holm (2007) señalaron que el reciclamiento de nitrógeno en las hojas senescentes de trigo involucra un sistema coordinado

entre el citosol y peroxisomas. En donde intervienen diferentes enzimas entre ellas PEPC, isocitrato dehidrogenasa, aconitato hidratasa y citrato sintetasa. PEPC esta presente también en hojas de las plantas  $C_3$  no senescentes, se le atribuyen funciones anapléroticas, puesto que proporciona los esqueletos carbonados para la biosíntesis de aminoácidos. Además, de regular el pH mediante la formación de ácido málico durante la reducción del nitrato (Häusler *et al.*, 2002). La estrecha relación de PEPC con el metabolismo de nitrógeno fue demostrada por Van Quy y Champigny (1992) y Duff y Chollet (1995) quienes observaron que fragmentos de hojas de trigo incubados en  $NO_3^-$  y luz incrementaron la actividad de PEPC.

En el presente estudio se observó una disminución gradual de la actividad enzimática de PEPC, en el testigo y en las plantas asperjadas con BAP. En las hojas no-senescentes de cebada, PEPC fue abundante en las células del mesófilo, pero durante la senescencia la distribución cambio y su presencia se restringió a los estomas y al floema. En hojas no-senescentes de pepino, PEPC se localizó en las células en palisada y en el tejido vascular. En las hojas senescentes se encontró en el floema. Debido a la distribución de la enzima en estos tejidos, Chen *et al* (2000) sugieren que PEPC interviene en el transporte de aminoácidos.

En el presente estudio el tratamiento con el regulador de crecimiento originó una mayor actividad de PEPC durante todo el proceso de senescencia de la segunda hoja foliar de trigo con diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ ). Inclusive en la última fase de la senescencia (41 DDS), las hojas asperjadas con BAP mantuvieron una actividad significativamente mayor ( $0.109 \pm 0.01 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{PF}$ ); que el testigo, ( $0.004 \pm 0.005 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{PF}$ ). En contraste, en *Mesembryanthemum crystallinum L* (planta CAM facultativa) la aplicación de BAP disminuyó la expresión de PEPC (Schmitt y Piepenbrock, 1992); pero en

fragmentos de hojas de maíz, este regulador de crecimiento estimuló la síntesis de PEPC (Sugiharto *et al.*, 1992).

Existe una interacción estrecha entre PEPC y PEPCK. Por ejemplo, en las hojas de plantas CAM ambas enzimas se encuentran en el citósol y su regulación es mediada por la misma proteína cinasa. Se sabe que PEPC se activa por la fosforilación, mientras que PEPCK se inactiva cuando esta fosforilada (Leegood y Walker, 2003). En el presente estudio se observó que el tratamiento con BAP incrementó la actividad de PEPC en comparación con el testigo, pero la actividad de PEPCK presentó fluctuaciones (disminuciones e incrementos) de forma similar al testigo; es probable que estas tendencias se deban a la co-regulación entre ambas enzimas.

La aspersión externa de BAP muestra efectos directos en la senescencia foliar. Se mantuvieron concentraciones altas de clorofila, proteínas solubles y aminoácidos totales, se incrementó el contenido de carbohidratos y se conservó una actividad mayor de PEPCK y PEPC en comparación con el testigo. Las modificaciones genéticas causan efectos similares, por ejemplo, en plantas de tabaco ( $P_{SA12-IPT}$ ). Wingler *et al.* (2005) encontraron efectos directos en el metabolismo primario. Las plantas mantienen altos niveles de clorofila, pero el ciclo de Calvin y la cadena transportadora de electrones disminuyen significativamente en las plantas transgénicas; a pesar de la presencia de los pigmentos fotosintéticos. Sin embargo, Wingler *et al.* (1998) y Jordi *et al.* (2000) demostraron que la sobre-expresión del gen *IPT* en las hojas senescentes de tabaco mantienen una mayor fijación de  $CO_2$ , que las plantas silvestres. Gutierrez-Martínez (2008) indicó que la aspersión externa de BAP mantiene la actividad fotosintética de las hojas. Por lo tanto, no se requiere de la utilización de sustratos,

como los lípidos de las membranas, para la generación de energía, es por ello que la integridad de las membranas se conserva en plantas asperjadas con citocininas y en las P<sub>SA12</sub>-IPT.

Durante la senescencia foliar, la membrana plasmática y las membranas de otros organelos, por ejemplo, las del retículo endoplásmico pierden su permeabilidad y fluidez debido a las modificaciones moleculares en la bicapa de lípidos que conduce a un incremento de ácidos grasos no eterificados en las membranas causada por las lipasas. Los ácidos grasos transformados son el sustrato para las lipoxigenasas, que originan la peroxidación de los lípidos y por consecuencia se pierde la integridad funcional de las membranas. Sin embargo, las citocininas retrasan la senescencia foliar por medio del incremento de la actividad de enzimas antioxidantes (Liu y Huang *et al.*, 2002; Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007). Incluso, los cloroplastos del mesófilo pueden regenerarse con tratamientos de citocininas (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999b). En el presente estudio se observó que el BAP retrasó el daño de las membranas, medido como la liberación de electrolitos, a los 41 DDS. El testigo incrementó la liberación de electrolitos en un 32%, mientras que el tratamiento con BAP se mantuvo sin cambios en 18%. En un estudio similar, Zhang *et al.* (2007) muestran que la liberación de electrolitos de segmentos de hojas de *Catharanthus roseus* L. incubados durante 10 días en BAP, se mantuvieron constantes y los cambios significativos ocurrieron en los últimos días del tratamiento. Las hojas tratadas con el regulador de crecimiento presentaron un porcentaje menor (30.40%) de liberación de electrolitos, que las hojas testigo (68.70%). Los cambios de la permeabilidad de la membrana plasmática se originan durante las últimas fases de la senescencia foliar por que se requiere mantener la integridad celular hasta que todos los nutrientes hayan sido exportados a los órganos en desarrollo (Lee y Grace Chen *et al.*, 2002).

En el presente trabajo se encontró que la aspersión externa de BAP a la segunda hoja foliar de trigo tiene efectos significativos en las macromoléculas del metabolismo primario. Las modificaciones inducidas por la aplicación externa de la citocinina se observaron después de la segunda fecha de aspersión (26 DDS). En ésta fecha se originaron incrementos estadísticamente no significativos de clorofila total, proteínas solubles, aminoácidos solubles y actividad de PEPC y PEPC. Lo que sugiere que BAP puede modificar o ajustar el metabolismo primario desde las fases iniciales de la senescencia. El incremento en el contenido de carbohidratos, aminoácidos, proteínas y pigmentos fotosintéticos indica que las rutas anabólicas permanecen activas, lo cual no ocurrió en el testigo, en donde se detectó disminución en el contenido de estos compuestos. El tratamiento con BAP originó una mayor acumulación de carbohidratos, lo cual indica que el regulador modifica las relaciones fuente-demanda, puesto que promueve una acumulación de fotoasimilados. Además, la citocinina incrementó y conservó una mayor actividad de PEPC y PEPC. Se sabe que estas enzimas intervienen en la biosíntesis de aminoácidos y regulación de pH; pero se demostró que el regulador de crecimiento disminuye la translocación de compuestos nitrogenados, por lo que probablemente ambas enzimas ayuden a regular el pH de las células. Las modificaciones al metabolismo primario permitieron retrasar la senescencia y conservar la integridad celular significativamente. Lo cual tiene importantes aplicaciones biotecnológicas, por ejemplo, en el retraso de la senescencia en pastos de forrajeros, hortalizas verdes y de hoja (brócoli, lechuga y espinaca) y retrasó de la senescencia del follaje en plantas ornamentales, etc.

## 8. CONCLUSIONES

La aspersión externa de la citocinina BAP retrasó la degradación de las principales biomoléculas (clorofila total, proteínas solubles y carbohidratos) del metabolismo primario de la segunda hoja de *Triticum aestivum* L cv. Temporalera:

- El tratamiento con BAP conservaron 40% de su clorofila total, mientras que el testigo sólo conservo 8% a los 41 días después de la siembra (DDS). La clorofila *a* fue menos estable que la clorofila *b* y los pigmentos accesorios (carotenoides y xantofilas) se mantuvieron en altas concentraciones durante todo el proceso.
- La citocinina BAP mantuvo una mayor concentración de los compuestos nitrogenados (proteínas y aminoácidos) que el testigo durante todo el proceso de senescencia con diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ ). Las proteínas solubles totales de las hojas tratadas con el regulador de crecimiento mantuvieron 30%, en contraste el testigo sólo 2% en el día 41 DDS. En relación con los aminoácidos totales en la última fase de la senescencia, el tratamiento con BAP mantuvo  $2.83 \pm 0.12 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$  y el testigo  $0.82 \pm 0.35 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$  de aminoácidos totales
- El tratamiento con el regulador de crecimiento conservo un alto porcentaje de la subunidad grande de Rubisco (LSU) en comparación con el testigo. Las diferencias estadísticas significativas se presentaron a partir del día 31 DDS y a los 41 DDS, el BAP retuvo 50% del contenido inicial de la LSU mientras que en las hojas testigo sólo se retuvo 5%.
- Los resultados del trabajo muestran que la aspersión externa de BAP modificó la tendencia de acumulación de los azúcares solubles y del almidón durante la senescencia foliar natural de la segunda hoja de trigo, en comparación con el testigo.

No obstante, que la acumulación de carbohidratos induce la senescencia, las hojas tratadas con la citocinina presentaron una mayor acumulación de éstos compuestos.

- Se observó una correlación entre el incremento de los azúcares y la degradación de Rubisco en el tratamiento con BAP, pero no en el testigo. Los niveles mayores de azúcares se observaron en las hojas tratadas con BAP a los 36 DDS, y en ésta fecha la LSU disminuyó significativamente (25%), por el contrario en el testigo, la máxima concentración de azúcares fue a los 31 DDS, mientras que los niveles de Rubisco disminuyeron significativamente cinco días antes (26 DDS), respecto a las hojas presenescentes (día 21 DDS).
- El tratamiento con BAP presentó una mayor actividad de PEPCK y PEPC que el testigo. A los 41 DDS, las hojas asperjadas con BAP conservaron 55% de su actividad de PEPCK, mientras que el testigo sólo mantuvo 1%. En esta fecha, la actividad de PEPC en el tratamiento con BAP mantuvo un mayor porcentaje de actividad (37%) que el testigo (1%) con respecto a los 21 DDS.
- La citocinina BAP promovió que se conservara la integridad celular mostrando valores significativamente menores (18%) que el testigo (32%), que incrementó marcadamente la liberación de electrolitos a los 41 DDS.
- Las modificaciones al metabolismo primario inducidas por BAP permitieron que las hojas presentaran un alto contenido de compuestos nitrogenados y azúcares. Además de conservar la integridad celular significativamente. Lo cual tiene importantes aplicaciones biotecnológicas como originar pastos de forraje con altos contenidos de proteínas, crear una posible alternativa para el almacenamiento poscosecha, y promover el retraso de la senescencia en plantas ornamentales.

9. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Becerril, G. y C. B. Peña-Valdivia. 2006.** Alteraciones fisiológicas provocadas por sequía en nopal (*Opuntia ficus-indica*). *Fitotecnia Mexicana* 29: 231-237.
- Balibrera-Lara, M. E., M. C González-García, F. Tahira, R. Ehneß, T. K. Lee, R. Proles, W. Tanner, and T. Roitsch. 2004.** Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *The Plant Cell* 16: 1276-1287.
- Benková, E., E. Witters, W. Van Dongen, J. Kolá, V. Matyka, V. Brzobohatý, H. Van Onckelen, and I. Machádková. 1999.** Cytokinins in tobacco and wheat chloroplasts occurrence and changes due to light/dark treatment. *Plant Physiology* 121: 245-252.
- Borkowska, B. and L. S. Jankiewicz. 2003.** Citocininas. pp. 93-122. In: L. S Jankiewicz (ed). Reguladores del crecimiento desarrollo y resistencia en plantas. Propiedades y acción. Universidad Autónoma de Chapingo. México.
- Bradford, M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72: 248-59.
- Brenner, W. G., G. A. Romanov, I. Köllmer, L. Bürkle1, and T. Schmölling. 2005.** Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal* 44: 314-333.
- Buchanan-Wollaston, V. 1997.** The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 48: 181-199.



- Buchanan-Wollaston, V., S. Earl, E. Harrison, E. Mathas, S. Navabpour, T. Page, and D. Pink. 2003.** The molecular analysis of leaf senescence- a genomic approach. *Plant Biotechnology Journal* 1: 3-22.
- Buchanan-Wollaston, V., T. Page, E. Harrison, E. Breeze, P. O. Lim, H. G. Nam, J-F. Lin, S-H. Wu, J. Swidsinski, K. Ishizaki, and C. J. Leaver. 2005.** Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 42: 567-585.
- Cabello, P., E. Agüera, and P. de la Haba. 2006.** Metabolic changes during natural ageing in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves: expression and activity of glutamine synthetase isoforms are regulated differently during senescence. *Physiologia Plantarum* 128: 175-185.
- Casati, P., M. V. Lara, and C. S. Andreo. 2000.** Induction of a C<sub>4</sub>- like mechanism of CO<sub>2</sub> fixation in *Egeria densa*, a submersed aquatica species. *Plant Physiology* 123: 1611-1621.
- Charlton W. L., B. Johnson, I. A. Graham, and A. Baker. 2005.** Non-coordinate expression of peroxisome biogenesis,  $\beta$ -oxidation and glyoxylate cycle genes in mature *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Reports* 23: 647-653.
- Chen, Z-H., R. P. Walker, R. M. Acheson, L. I. Técsi, A. Wingler, P. J. Lea, and R. C. Leegood. 2000.** Phosphoenolpyruvate carboxykinase in cucumber plants is increased both by ammonium and by acidification, and is present in the phloem. *Planta* 219: 48-58.

- Chiba, A., H. Ishida, N. K. Nishizawa, A. Makino, and T. Mae. 2003.** Exclusion of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxigenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant Cell Physiology* 44: 914-921.
- Dai, N., A. Shaffer, M. Petreikov, Y. Shahak, Y. Giller, K. Ratner, A. Levine, and D. Granot. 1999.** Overexpression of *Arabidopsis* hexokinases in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *The Plant Cell* 11: 1253-1266.
- Delgado-Alvarado, A., R. P. Walker, and R. C. Leegood. 2007.** Phosphoenolpyruvate carboxykinase in developing pea seeds is associated with tissues involved in solute transport and is nitrogen-responsive. *Plant Cell and Environment* 30: 225-235.
- Diaz, C., S. Purdy, A. Christ, J. F. Morot-Gaudry, A. Wingler, and C. Masclaux-Daubresse. 2005.** Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*: a metabolic profiling approach. *Plant Physiology* 138: 898-908.
- Duff, S. and R. Chollet. 1995.** *In vivo* regulation of wheat leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation. *Plant Physiology* 107: 775-782.
- Echevarría, C. and J. Vidal. 2003.** The unique phosphoenolpyruvate carboxylase kinase. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 541-547.
- Eckhardt, U., B. Grimm, and S. Hörtensteiner. 2004.** Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. *Plant Molecular Biology* 56: 1-14.
- Franco-Zorrilla, J. M., A. C. Martín, A. Leyva, and J. Paz-Ares. 2005.** Interaction between phosphate-starvation, sugar, and cytokinin signaling in *Arabidopsis* and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3. *Plant Physiology* 138: 847-857.

- Frank, J., R. J. Clarke, J. Vater, and J. F. Holzwarth. 2001.** Influence of allosteric effectors on the kinetics and equilibrium binding of phosphoenolpyruvate (PEP) to phosphoenolpyruvate (PEPC) from *Zea mays*. *Biophysical Chemistry* 92: 53-64.
- Gan, S. and R. M. Amasino. 1995.** Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270: 1986-1988.
- Gay, A. P. and H. Thomas. 1995.** Leaf development in *Lolium temulentum* L.: photosynthesis in relation to growth and senescence. *New Phytologist* 130: 159-168.
- Golombek, S., U. Heim, C. Horstmann, U. Wobus, and H. Weber. 1999.** Phosphoenolpyruvate carboxylase in developing seed of *Vicia faba* L.: gene expression and metabolic regulation. *Planta* 208: 66-72.
- González, M. C., R. Sánchez, and F. J. Cejudo. 2003.** Abiotic stresses affecting water balance induce phosphoenolpyruvate carboxylase expression in roots of wheat seedlings. *Planta* 216: 985-992.
- Gregersen, P. L. and P. B. Holm. 2007.** Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology Journal* 5: 192-206.
- Guivarc'h, A., J. Rembur, M. Gotees, T. Roitsch, M. Noin, T. Schmölling, and D. Chriqui. 2005.** Local expresión of the *ipt* gene in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L. C. SR1) axillary buds establishes a role for cytokinins in tuberization and sink formation. *Journal of Experimental Botany* 53: 621-629.
- Häusler, R. E., H.J. Hirsch, F. Kreuzaler, and C. Peterhänsel. 2002.** Overexpression of C<sub>4</sub>-cycle enzymes in transgenic C<sub>3</sub> plants: a biotechnological approach to improve C<sub>3</sub>-photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 53: 591-607.

- Himelblau, E. and R. M. Amasino. 2001.** Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology* 158: 1317-1323.
- Hopkins, M., C. Taylor, Z. Liu, F. Ma, L. McNamara, T-W. Wang and J. E. Thompson. 2007.** Regulation and execution of molecular disassembly and catabolism during senescence. *New Phytologist* 175: 201-214.
- Hörtensteiner, S. 2006.** Chlorophyll degradation during senescence. *Annual Review of Plant Biology* 57: 55-77.
- Hörtensteiner, S. and U. Feller. 2002.** Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany* 53: 927-937.
- Huynh, L. N., T. V. Toai, J. Streeter, and G. Banowitz. 2005.** Regulation of flooding tolerance of SAG12:ipt *Arabidopsis* plants by cytokinin. *Journal of Experimental Botany* 56: 1397-1407.
- Izui, K., H. Matsumura, T. Furumoto, and Y. Kai. 2004.** Phosphoenolpyruvate carboxylase a new era of structural biology. *Annual Review of Plant Biology* 55: 69-84.
- Jongebloed, U., J. Szederkényi, K. Hartig, C. Schobert, and E. Komor. 2004.** Sequence of morphological and physiological events during natural ageing of castor bean leaf: sieve tube occlusions and carbohydrate back-up precede chlorophyll degradation. *Physiology Plantarum* 120: 338-346.
- Jordi, W., A. Schapendonk, E. Davelaar, G. M. Stopen, C. S. Pot, R. De Visser, J. A. van Rhijn, S. Gan, and R. M. Amasino. 2000.** Increased cytokinin levels in transgenic P<sub>SAG12</sub>-IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *Plant Cell and Environment* 23: 279-289.

- Keskitalo, J., G. Bergquist, P. Gardeström, and S. Jansson. 2005.** A cellular timetable of autumn senescence. *Plant Physiology* 139: 1635-1648.
- Kim, J. D. and S. M. Smith. 1994.** Molecular cloning of cucumber phosphoenolpyruvate carboxykinase and developmental regulation of genes expression. *Plant Molecular Biology* 26: 423-434.
- Koch, K. 2004.** Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion Plant Biology* 7: 235-246.
- Kolodziejek, I., J. Koziol, M. Waleza, and A. Mostowska. 2003.** Ultrastructura of mesophyll cells and pigment content in senescing leaves of maize and barley. *Journal Plant Growth Regulation* 22: 217-227.
- Lalonde, S., D. Wipf, and W. B. Frommer. 2004.** Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annual Review of Plant Biology* 55: 341-372.
- Lee, R-H. and S-C. Grace Chen. 2002.** Programmed cell death during rice leaf senescence is nonapoptotic. *New Phytologist* 155: 25-32.
- Leegood, R. C. and R. P. Walker. 2003.** Regulation and roles of phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414: 204-210.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson, and M. M. Cox. 1995.** Principios de bioquímica. 2da ed. Editorial Omega, Barcelona. España. 1013 pp.
- Lichtenthaler, H. K. and A. R. Wellburn. 1983.** Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b in leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591-592.

- Lim, P. O., H. J. Kim, and H. G. Nam. 2007.** Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* 58: 115-136.
- Liu, X. H. and B. R. Huang. 2002.** Cytokinin effects on creeping bentgrass response to heat stress. II: Leaf senescence and antioxidante metabolism. *Crop Science* 42: 466-472.
- Lu, C., Q. Lu, A. J. Zhang, and T. Kuang. 2001.** Characterization of photosynthetic pigment composition, photosystem II photochemistry and thermal energy dissipation during leaf senescence of wheat plants grow in the fiel. *Journal of Experimental Botany* 52: 1805-1810.
- Luo, S., H. Ishida, A. Makino, and T. Mae. 2002.** Fe<sub>2</sub><sup>+</sup>-catalyzed site-specific cleavage of the large subunit of Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase close to the active site. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 12382-12387.
- Makino, A., M. Tadahiko, and O. Koji. 1986.** Colorimetric measurement of protein stained with coomassie brilliant blue R on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis by eluting with formamide. *Agricola Biologic Chemistry* 50: 1911-1912.
- Martínez-Gutiérrez, R., H. Zavaleta-Mancera, L. Ruíz-Posadas, A. Delgado-Alvarado y R. Vaca-Paulín. 2008.** Intercambio de gases y relaciones hídricas durante el retraso de la senescencia foliar de trigo (*Triticum aestivum* L.) por la citocinina BAP. *Interciencia* 33: 140-145.
- Masclaux, C., I. Quillere, A. Gallais, and B. Hirel. 2001.** The challenge of remobilization in plant nitrogen economy. A survey of Picio-agronomic and molecular approaches. *Annals of Applied Biology* 138: 69-81.

- Masclaux, C., M. H. Valadier, N. Brugière, J. F. Morot-Gaudry, and B. Hirel. 2000.** Characterization of the sink/source transitions in tobacco (*Nicotiana tabacum* L) shoot in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* 211: 510-518.
- Masclaux-Daubresse, C., E. Carrayol, and M-H. Valadier. 2005.** The two nitrogen mobilization- and senescence-associated GS1 and GDH genes are controlled by C and N metabolites. *Planta* 221: 580-588.
- Matile, P., S. Hortensteiner, H. Thomas, and B. Krautler. 1999.** Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant Physiology* 112: 1403-1409.
- McCabe, M. S., L. C. Garratt, F. Schepers, W. J. R. M. Jordi, G. M. Stoopen, E. Davelaar, J. H. A. van Rhijn, J. B. Power, and M. R. Davey. 2001.** Effects of P<sub>SAG12</sub>-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiology* 127: 505-516.
- Mok, D. W. and M. C. Mok. 2001.** Cytokinin metabolism and action. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 52: 89-118.
- Montgomery, C. D. 2004.** Diseño y análisis de experimentos. 2da ed. Editorial Limusa. México. 686 pp.
- Moore, B., L. Zhou, F. Rolland, Q. Hall, W. H. Cheng, Y. X. Liu, I. Hwang, T. Jones, and J. Sheen. 2003.** Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300: 332-336.
- Nakano, R., H. Ishida, A. Makino, and T. Mae. 2006.** *In vivo* fragmentation of large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species in an intact leaf of cucumber under chilling-light conditions. *Plant Cell Physiology* 47: 270-276.

- Noodén, L. D., J. J. Guiamet, and I. John. 1997.** Senescence mechanisms. *Physiology Plantarum* 101: 746-753.
- Osuna, L., J. N. Pierre, M. C. González, R. Alvarez, F. J. Cejudo, C. Echevarría, and J. Vidal. 1999.** Evidence for a slow-turnover form of the Ca<sup>2+</sup>- independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in the aleurone endosperm tissue of germinating barley seeds. *Plant Physiology* 119: 511-520.
- Ougham, H. J., P. Morris, and H. Thomas. 2005.** The colors of autumn leaves as symptoms of cellular recycling and defenses against environmental stresses. *Current Topics in Developmental Biology* 66: 135-160.
- Owen, O. E., S. C. Kalhan, and R. W. Hanson. 2002.** The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 30409-30412.
- Palavan-Ünsal, N., S. Cag, E. Cetil, and D. Büyuktuncer. 2002.** Retardation of senescence by meta-topolin in wheat leaves. *Journal of Cell and Molecular Biology* 1: 101-108.
- Parrot, D. L., K. McInnerney, U. Feller and A. M. Fisher. 2007.** Steam-girdling of barley (*Hordeum vulgare*) leaves leads to carbohydrate accumulation and accelerated leaf senescence, facilitation transcriptomic analysis of senescence-associated genes. *New Phytologist* 176: 56-69.
- Parry, M. A. J., P. J. Andralojc, S. Khan, P. J. Lea, and A. J. Keys. 2002.** Rubisco activity effects of drought stress. *Annals of Botany* 89: 833-839.
- Paul, M. J. and T. K. Pellny. 2003.** Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany* 54: 539-547.



- Popova, L. P., Z. G. Stoinova, and L. T. Maslenkova.** 1995. Involvement of abscisic acid in photosynthetic process in *Hordeum vulgare* L during salinity stress. *Journal of Plant Growth Regulation* 14: 211-218.
- Pospíšilová, J., H. Synková, and J. Rulcová.** 2000. Cytokinins and water stress. *Biologia Plantarum* 43: 321-328.
- Pourtau, N., R. Jennings, E. Pelzer, J. Pallas, and A. Wingler.** 2006. Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta* 224: 556-568.
- Prášil, I., I. and J. Zámecnik.** 1998. The use of conductivity measurement method for assessing freezing injury. I. Influence of leakage time, segment number, size and shape in a sample on evaluation of the degree on injury. *Environmental and Experimental Botany* 40: 1-10.
- Pružinská, A. P., I. Anders, S. Aubry, N. Schenk, E. Tapernoux-Lüthi, T. Müller, B. Kräutler, and S. Hörtensteiner.** 2007. *In vivo* participation of red chlorophyll catabolite reductase in chlorophyll breakdown. *The Plant Cell* 19: 369-387.
- Raghavendra, A. S., Z. Yin, and U. Heber.** 1993. Light-dependent pH changes in leaves of C<sub>4</sub> plants. *Planta* 189: 278-287.
- Riefler, M., O. Novak, M. Strnad, and T. Schmülling.** 2006. *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *The Plant Cell* 18: 40-54.
- Roitsch, T. and R. Ehneß.** 2000. Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regulation* 32: 359-367.

- Roitsch, T., R. Ehneß, M. Goetz, B. Hause, M. Hofmann, and A. K. Sinha. 1999.** Regulation and function of extracellular invertase from higher plants in relation to assimilate partitioning, stress responses and sugar signaling. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 815-825.
- Rosen, H. 1957.** A modified ninhydrin colorimetric analysis form amino acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 67: 10-15.
- Rylott E. L., A. D. Gilday and I. A. Graham. 2003.** The gluconeogenic enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Arabidopsis* is essential for seedling establishment. *Plant Physiology* 131: 1834-1842.
- Sakakibara, H. 2006.** Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* 57: 431-449.
- Sakakibara, H., K. Takei, and N. Hirose. 2006.** Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends in Plant Science* 11: 440-448.
- Sakamoto, W. 2006.** Protein degradation machineries in plastids. *Annual Review of Plant Biology* 57: 599-620.
- Sánchez-Urdaneta, A. B., C. B. Peña-Valdivia, J. R. Aguirre, and R. C. Trejo. 2004.** Efectos del potencial de agua en el crecimiento radical de plántulas de *Agave salmiana* Otto ex salm-dyck. *Interciencia* 29: 626-631.
- Sato, Y., R. Morita, M. Nishimura, H. Yamaguchi, and M. Kusaba. 2007.** Mendel's green cotyledon gene encodes a positive regulator of the chlorophyll-degrading pathway. *The National Academy of Sciences of the USA* 104: 14169-14174.

- Schmitt, J. M. and M. Piepenbrock. 1992.** Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase and crassulacean acid metabolism induction in *Mesembryanthemum crystallinum* L. by cytokinin. *Plant Physiology* 99: 1664-1669.
- Shaffer, A. A., H. Nerson, and E. Zamski. 1991.** Premature leaf chlorosis in cucumber associated with high starch accumulation. *Journal of Plant Physiology* 138: 186-190.
- Sharma-Natu, P. and M. C. Ghildiyal. 2005.** Potential targets for improving photosynthesis and crop yield. *Current Science* 88: 1918-1928.
- Sholes, J. D., P. J. Lee, P. Horton, and D. H. Lewis. 1994.** Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytologist* 126: 213-222.
- Steiner, A. A. 1984.** The universal nutrient solution. Sixth Int. Congr. On Soilless Culture. ISOSC Proceeding. The Netherlands. pp: 663-649.
- Sugiharto, B., J. N. Burnell, and T. Sugiyama. 1992.** Cytokinin is required to induce the nitrogen-dependent accumulation of mRNAs for phosphoenolpyruvate carboxylase and carbonic anhydrase in detached maize leaves. *Plant Physiology* 100: 153-156.
- Tanaka, A. and R. Tanaka. 2006.** Chlorophyll metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 248-255.
- Thomas, H., H. Ougham, P. Canter, and I. Donnison. 2002.** What staygreen mutants tell us about nitrogen remobilization in leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 53: 801-808.
- Tovar-Méndez, A. and R. A. Muñoz-Clares. 2001.** Kinetics of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays* leaves at high concentration of substrates. *Biochemical Biophysics Acta* 1546: 242-252.

- Turner, W. L. and W. C. Plaxton. 2000.** Purification and characterization of cytosolic pyruvate kinase from banana fruit. *Biochemical Journal* 352: 875-882.
- Uedan, K. and T. Sugiyama. 1976.** Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant Physiology* 57: 906-910.
- Van Quy, L., C. Foyer, and M. L. Champigny. 1991.** Effect of Light and  $\text{NO}_3^-$  on wheat leaf phosphoenolpyruvate carboxylase activity. Evidence for covalent modulation of  $\text{C}_3$  enzyme. *Plant Physiology* 97: 1476-1482.
- Vlcková, A., M. Spundova, E. Kotabová, R. Novotný, K. Dolezal, and J. Naus. 2006.** Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light. *Physiologia Plantarum* 126: 257-267.
- Walker, R. P. and R. C. Leegood. 1995.** Purification and phosphorylation in vivo and in vitro, of phosphoenolpyruvate carboxykinase from cucumber cotyledons. *FEBS Letters* 362: 70-74.
- Walker, R. P. and R. C. Leegood. 1996.** Phosphorylation of phosphoenolpyruvate carbokinase in plants. Studies in plants with  $\text{C}_4$  photosynthesis and crassulacean acid metabolism and in germinating seeds. *Biochemical Journal* 317: 653-658.
- Walker, R. P., C. Zhu-Hui, L. I. Técsi, F. Famiani, P. J. Lea, and R. C. Leegood. 1999.** Phosphoenolpyruvate carbokinase plays a role in interactions of carbon and nitrogen metabolism during grape seed development. *Planta* 210: 9-18.
- Walker, R. P., S. J. Trevanion, and R. C. Leegood. 1995.** Phosphoenolpyruvate carboxykinase from higher plants: purification from cucumber and evidence of rapid proteolytic cleavage in extracts from a range of plant tissues. *Planta* 195: 58-63.

- Walker, R. P., Z-H. Chen, K. E. Johnson, F. Famiani, L. Tecsí, and R. C. Leegood. 2001.** Using immunohistochemistry to study plant metabolism: the examples of its use in the localization of amino acids in plant tissues, and of phosphoenolpyruvate carboxykinase and its possible role in pH regulation. *Journal of Experimental Botany* 52: 565-576.
- Walker, R. P., Z-H. Chen, R. M. Acheson, and R. C. Leegood. 2002.** Effects of phosphorylation on phosphoenolpyruvate carboxykinase from the C<sub>4</sub> plant *Guinea grass*. *Plant Physiology* 128: 165-172.
- Wingler, A., A. von Schaewen, R. C. Leegood, P. J. Lea, and W. P. Quick. 1998.** Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugar, and light. Effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Plant Physiology* 116: 329-335.
- Wingler, A., M. Marès, and N. Pourtau. 2004.** Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence. *New Phytologist* 161: 781-789.
- Wingler, A., S. Purdy, J. A. MacLean, and N. Pourtau. 2006.** The role of sugar in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 57: 391-399.
- Woo, H. R., K. M. Chung, J. H. Park, S. A. Oh, T. Ahn, S. H. Hong, S. K. Jang, and H. G. Nam. 2001.** ORE9 and F-box protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 1779-1790.
- Yoshida, S. 2003.** Molecular regulation of leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 79-84.
- Zavaleta-Mancera, H. A., B. J. Thomas, H. Thomas, and I. M. Scott. 1999b.** Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. II. Redifferentiation of plastids. *Journal of Experimental Botany* 50: 1683-1699.

- Zavaleta-Mancera, H. A., H. López-Delgado, H. Loza-Tavera, M. Mora-Herrera, C. Trevilla-García, M. Vargas-Suárez, and H. Ougham. 2007.** Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *Journal of Plant Physiology* 164: 1572-1582.
- Zavaleta-Mancera, H. A., K. A. Franklin, H. J. Ougham, H. Thomas, and I. M. Scott. 1999a.** Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. I. Reappearance of NADPH-protochlorophyllide oxireductase and light-harvesting chlorophyll a/b binding protein. *Journal of Experimental Botany* 50: 1677-1682.
- Zeeman, S. C., A. Tiessen, E. Pilling, K. L. Kato, A. M. Donald, and A. M. Smith. 2002.** Starch synthesis in *Arabidopsis*. Granule synthesis, composition, and structure. *Plant Physiology* 129: 516-529.
- Zeeman, S. C., S. M. Smith, and A. M. Smith. 2004.** The breakdown of starch in leaves. *New Phytologist* 163: 247-261.
- Zhang, L., D. Xiang, J. Wang, and L. Li. 2007.** Rapid and non-invasive detection of plants senescence using a delayed fluorescence technique. *Photochemical & Photobiological Sciences* 6: 635-641.
- Zimmermann P. and U. Zentgraf. 2005.** The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular and Molecular Biology Letters* 10: 515-534.

## 10. ANEXOS

**Cuadro 1A.** Prueba Bondad y ajuste ( $x^2$ ) y Bartlett de diferentes variables de la segunda hoja de trigo durante la senescencia natural, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua).

Prueba	Clorofila total		Proteínas solubles totales		Clorofila a		Clorofila b		Aminoácidos	
	Testigo	BAP	Testigo	BAP	Testigo	Testigo	Testigo	BAP	Testigo	BAP
Bondad y ajuste ( $x^2$ ) ( $P \geq 0.05$ )	6.60	6.60	7.79	5.20	3.1	9.4	3.80	3.80	2.40	6.60
Bartlett ( $P \geq 0.05$ )	1.59		1.26		1.85		1.29		1.86	

Los valores de  $x^2$  ( $P \geq 0.05$ ) indican que la variable si presenta una distribución y Bartlett ( $P \geq 0.05$ ) señala que las varianzas son homogéneas.

**Cuadro 2A.** Prueba Bondad y ajuste ( $x^2$ ) y Bartlett de diferentes variables de la segunda hoja de trigo durante la senescencia natural, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua).

Prueba	Rubisco		Glucosa		Fructosa		Sacarosa		Membranas	
	Testigo	BAP	Testigo	BAP	Testigo	BAP	Testigo	BAP	Testigo	BAP
Bondad y ajuste ( $x^2$ ) ( $p \geq 0.05$ )	10.79	3.79	5.19	8.70	3.10	3.80	1.69	0.99	18.19	3.80
Bartlett ( $p \geq 0.05$ )	1.35		1.28		1.84		1.22		1.59	

Los valores de  $x^2$  ( $P \geq 0.05$ ) indican que la variable si presenta una distribución y Bartlett ( $P \geq 0.05$ ) señala que las varianzas son homogéneas.

**Cuadro 3A.** Cuadrados medios del análisis de varianza (ANOVA) de las variables con distribución normal y varianzas homogéneas (clorofila total, proteínas, clorofila *a*, clorofila *b*, aminoácidos) de la segunda hoja de trigo durante la senescencia natural, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua).

<b>Fuente de variación</b>	<b>g. l.</b>	<b>Clorofila total</b>	<b>Proteínas solubles totales</b>	<b>Hexosas</b>	<b>Clorofila <i>a</i></b>	<b>Clorofila <i>b</i></b>	<b>Aminoácidos</b>
Tratamientos	9	0.44	42.27	15286.2	0.30	0.015	26.36
Error	30	0.03	1.88	3055.94	0.02	0.001	0.40
Total	39						
F ( $P \leq 0.05$ )		13.86	24.08	5.00	13.18	10.20	65.73
D.S.H.							
P $\leq 0.05$ )		0.43	3.30	133.34	0.36	0.09	1.52

$P \leq 0.05$  indica diferencias estadísticas significativas entre el testigo y el tratamiento con BAP.

**Cuadro 4A.** Cuadrados medios del análisis de varianza (ANOVA) de las variables con distribución normal y varianzas homogéneas (rubisco, glucosa, fructosa, sacarosa y membranas) de la segunda hoja de trigo durante la senescencia natural, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua).

<b>Fuente de variación</b>	<b>g. l.</b>	<b>Rubisco</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Fructosa</b>	<b>Sacarosa</b>	<b>Membrana</b>
Tratamientos	9	1392.1	5773.86	3485.14	429.59	104.37
Error	30	77.61	589.374	606.52	81.22	3.98
Total	39					
F ( $P \leq 0.05$ )		17.94	9.80	5.75	5.29	26.17
D.S.H. ( $P \leq 0.05$ )		21.25	58.55	59.40	21.73	5.77

$P \leq 0.05$  indica diferencias estadísticas significativas entre el testigo y el tratamiento con BAP.



**Cuadro 5A.** Prueba Bondad y ajuste ( $\chi^2$ ), prueba de Bartlett y Kruskal-Wallis de las variables que no presentaron una distribución normal y varianzas homogéneas: unidades SPAD, xantofilas + carotenoides, almidón, PEPC y PEPCK de la segunda hoja de trigo durante la senescencia natural, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua).

Prueba	Unidades SPAD.		Carotenoides +xantofilas		Almidón		PEPC		PEPCK	
	Testigo	BAP	Testigo	BAP	Testigo	BAP	Testigo	BAP	Testigo	BAP
Bondad y ajuste ( $\chi^2$ ) ( $P \leq 0.05$ )	42.72	29.23	16.39	20.3	3.10	13.60	17.10	1.70	3.10	10.80
Bartlett	1.18 ( $P \geq 0.05$ )		2.60 ( $P \leq 0.05$ )		1.73 ( $P \geq 0.05$ )		3.74 ( $P \leq 0.05$ )		2.76 ( $P \leq 0.05$ )	
Kruskal-Wallis ( $P \leq 0.05$ )	91.66		20.14		27.76		33.71		29.08	

Los valores de  $\chi^2$  ( $P \leq 0.05$ ) indican que la variable no presenta una distribución normal, Bartlett ( $P \geq 0.05$ ) señala que las varianzas son homogéneas y  $P \leq 0.05$ , indica que hay diferencias estadísticas en las desviaciones estándar. Kruskal-Wallis ( $P \leq 0.05$ ) indica diferencias estadísticas significativas entre el testigo y el tratamiento con BAP.