



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN  
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO  
BOTÁNICA

**EFFECTO DE LA CITOCININA BAP EN LA SENESCENCIA  
FOLIAR NATURAL DE *Triticum aestivum* var.  
Temporalera; FOTOSÍNTESIS, RUBISCO Y  
TRANSPIRACIÓN**

RICARDO MARTÍNEZ GUTIÉRREZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2007

La presente tesis titulada “**EFFECTO DE LA CITOCININA BAP EN LA SENESCENCIA FOLIAR NATURAL DE *Triticum aestivum* var. Temporalera; FOTOSÍNTESIS, RUBISCO Y TRANSPIRACIÓN**”, fue realizada por el alumno **Ricardo Martínez Gutiérrez**, 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**

PROGRAMA EN BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO \_\_\_\_\_  
Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera

ASESOR \_\_\_\_\_  
Dra. Adriana Delgado Alvarado

ASESOR \_\_\_\_\_  
Dra. Lucero del Mar Ruíz Posadas

ASESOR \_\_\_\_\_  
Dra. Rocío Vaca Paulín

Montecillo, Texcoco, Estado de México. Julio de 2007

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca otorgada a Ricardo Martínez Gutiérrez, 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.

Al Programa de Botánica del Colegio de Postgraduados (CP), por haberme formado académicamente y darme las facilidades para la realización de mi postgrado.

A la Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera, por su conocimiento, paciencia, orientación y dirección del presente trabajo y mi estancia en el CP; así como su gran calidad humana como persona y profesora.

A la Dra. Adriana Delgado Alvarado, por su asesoría, acertados comentarios y paciencia en la elaboración y escritura de la tesis, así como por su calidad humana que hicieron mi estancia muy grata.

A la Dra. Lucero del Mar Ruíz Posadas, por su gran valor como ser humano así como la confianza que me dio para poder expresar mis ideas y tomar decisiones sobre el trabajo.

A la Dra. Rocío Vaca Paulín, por sus aportaciones en el presente trabajo, que ayudaron a mejorarlo.

A la Dra. Herminia Loza Tavera y al Dr. Martín Vargas (Postgrado en Química, UNAM), por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A los trabajadores del Colegio de Postgraduados, en especial al Sr. Juan Zaragoza y Miguel Vega, por la ayuda, amistad y facilidades en la elaboración del presente trabajo.

## DEDICATORIA

*A Dios, por darme la fortaleza y las ganas de seguir adelante.*

*A mis padres: María Elena y Eduardo por todo el apoyo, cariño, confianza y guía en la vida.*

*A mi Abue Josefina, con gran admiración por todas las cosas maravillosas que recibí de ella mientras estaba con nosotros; por ese legado de sabiduría y fortaleza hasta el último momento*

*A todos los profesores del Colegio de Postgraduados que contribuyeron con su conocimiento, para que entendiera un poco mas los paradigmas de la ciencia y ser menos ignorante.*

*A la Dra. Araceli Zavaleta Mancera, Lucero del Mar Ruíz Posadas, Adriana Delgado Alvarado y Rocío Vaca Paulín por sus enseñanzas y apoyo.*

*A todos mis amigos en especial a CF, RG, ET, IV, EC, AO, RB, MAE, SH, MC, AM, MB, IH, GM, TR, MK, AC y OJ, a quienes aprecio y quiero.*

*En general a toda mi familia*

<b>CONTENIDO</b>	<b>Págs.</b>
RESUMEN GENERAL.....	ix
GENERAL SUMMARY.....	x
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>2</b>
2.1. Senescencia foliar.....	2
2.1.1 Regulación génica de la senescencia foliar.....	3
2.1.2 Degradación de clorofila.....	4
2.1.3 Degradación de proteínas cloroplásticas.....	7

2.1.4 Senescencia del cloroplasto.....	8
2.1.5 Ribulosa 1-5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco).....	10
2.2 Citocininas.....	12
2.2.1 Estructura y lugares de síntesis.....	12
2.2.2 Actividad biológica de las citocininas.....	14
2.2.3 Biosíntesis de la citocininas.....	15
2.2.4 Retraso de la senescencia foliar.....	16
2.3. Senescencia y relaciones hídricas.....	18
2.3.1 Potencial hídrico y sus componentes.....	18
2.3.2 Citocininas y las relaciones hídricas.....	20
2.3.3 Factores que intervienen en la pérdida de agua foliar.....	22
2.3.4 Senescencia y fotosíntesis.....	25
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
3.1 General.....	27
3.2 Particulares.....	27
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>28</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
5.1 Siembra y obtención del material biológico.....	29
5.2 Soluciones BAP y control.....	29
5.3 Cuantificación química de pigmentos fotosintéticos.....	30
5.4 Calibración del SPADmeter.....	30
5.5 EXPERIMENTO 1: Determinación de la concentración óptima de BAP en el retraso de la senescencia foliar.....	32
5.6 Experimento 2: Efecto de 0.1mM de BAP en la senescencia foliar de trigo.....	32
5.6.1 Cuantificación química de pigmentos fotosintéticos.....	33
5.6.2 Extracción y cuantificación de proteínas solubles totales.....	33
5.6.3 Niveles de Rubisco.....	34
5.6.4 Población de plastidios.....	35
5.6.5 Relaciones hídricas ( $\Psi_A$ , $\Psi_s$ y $\Psi_s$ ).....	36

5.6.6 Intercambio de gases ( $g_s$ y fijación de $CO_2$ ).....	37
5.6.7 Análisis estadístico.....	38
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
6.1 Calibración del SPADmeter.....	39
6.2 Experimento 1: Determinación de la concentración óptima BAP en el retraso de la senescencia foliar.....	42
6.3 Experimento 2: Efecto de 0.1 mM de BAP en la senescencia foliar de trigo.....	44
6.3.1 Pigmentos fotosintéticos totales.....	44
6.3.2 Proteína soluble total.....	47
6.3.3 La subunidad grande (LSU) de Rubisco.....	49
6.3.4 Población de plastidios.....	51
6.3.5 Relaciones hídricas ( $\Psi_A$ , $\Psi_s$ y $\Psi_s$ ).....	54
6.3.6 Intercambio de gases ( $g_s$ y fijación de $CO_2$ ).....	56
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	<b>59</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	<b>76</b>
<b>9. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>78</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Págs.</b>
Cuadro 1. Unidades SPAD determinadas en la segunda hoja madura de <i>T. aestivum</i> var. Temporalera, con diferentes niveles de amarillamiento.....	39
Cuadro 2. Valores correspondientes a la pendiente, ordenada y $r^2$ .....	40
Cuadro 3. Efecto del BAP en la Chl total, Chl <i>a</i> y <i>b</i> , $x+c$ y razón de Chl total: $x+ c$ de la segunda hoja de <i>T. aestivum</i> durante la senescencia (21-41 DDS).....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Degradación de la clorofila.....	6
Figura 2.	Estructura de algunas citocininas naturales y sintéticas.....	14
Figura 3.	Figura 3. Espectro de absorbancia de la clorofila extraída con acetona al 80% de una hoja.....	31
Figura 4.	Concentración entre clorofila relativa total y unidades SPAD en 60 hojas de trigo.....	41
Figura 5.	Efecto de tres concentraciones de BAP en la retención relativa de clorofila (unidades SPAD), durante 15 días de senescencia.....	43
Figura 6.	Concentración de proteína soluble total de la segunda hoja de <i>T. aestivum</i> por efecto de BAP (0.1 Mm) y solución control (CT).....	48
Figura 7.	Contenido relativo de LSU de Rubisco expresada en unidades de densidad óptica·mm <sup>2</sup> . (A) SDS-PAGE de hojas de trigo tratadas con BAP (0.1 mM) y solución control (CT), los subíndices indican el día de muestreo. (B) Contenido relativo de LSU expresado en unidades de densidad óptica (UDO·mm <sup>-2</sup> ) durante la senescencia foliar de la segunda hoja en <i>T. aestivum</i> .....	50



Figura 8.	Población de plastidios medida como el número de plastidios por célula en corte transversal expresado en porcentaje (%) y Chl total, durante la senescencia de la segunda hoja madura de <i>T. aestivum</i> , asperjada efecto de BAP (0.1 Mm) y solución control (CT).....	52
Figura 9.	Corte transversal semifino (1µm) de hojas de trigo asperjadas con 0.1 mM de BAP (F – J) y solución control (A – E) durante la senescencia foliar. A y F verde 21 DDS, B y G 26 DDS, C y H 31 DDS, D y I 36 DDS y E y J 41DDS.....	53
Figura 10.	Relaciones hídricas en la senescencia de la segunda hoja madura de <i>T. aestivum</i> por efecto de BAP (0.1 Mm) y solución control (CT). $\Psi_A$ (A), $\Psi_s$ (B) y $\Psi_t$ (C).....	55
Figura 11.	Tasa de asimilación de CO <sub>2</sub> (A) y conductancia estomática (B) en la senescencia de la segunda hoja madura de <i>T. aestivum</i> por efecto de BAP (0.1 Mm) y solución control (CT).....	58

## RESUMEN

La senescencia foliar natural de *Triticum aestivum* var. Temporalera, fue retrazada con aspersiones de 6-bencilaminopurina (BAP) 0.1 mM, cada tres días durante 20 días en invernadero. La senescencia de las hojas control (agua) estuvo caracterizada por la pérdida de clorofilas (88%) y proteínas solubles (96%), así como por una reducción de la población de plastidios (52.5%) a los 41 días después de la siembra (DDS). La concentración de xantofilas y

carotenoides se redujo en un 53.9%, la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> disminuyó en un 94%, la cual se correlaciono significativamente con la degradación de la LSU de Rubisco. El potencial hídrico  $\Psi_A$  disminuyó de -0.38 MPa a -0.62 MPa durante la senescencia; el potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) se incrementó de -1.3 MPa a -1.1 MPa, asociado a una pérdida de turgor en las células. En contraste BAP, mantuvo significativamente más alta la población de plastidios (74.5%), retuvo el 75.7% de la clorofila total y el 50% de la proteína soluble. Esta citocinina también promovió altos  $\Psi_A$  con respecto a los controles, disminuyendo en un 20 % (-0.48 MPa) con respecto al estadio inicial ó verde; incrementó el  $\Psi_s$  de -1.0 MPa a -1.10 MPa; el  $\Psi_t$  fue significativamente mayor que sus controles entre el día 31 y 41 DDS. La conductancia estomática ( $g_s$ ) se mantuvo en un 68% (864.9 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) con respecto al valor inicial (1272 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). La tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> (4 μmol de CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) no presento valores significativamente diferentes de los observados en el estado verde pre-senescente a los 41 DDS. La proteína LSU de Rubisco retrasó su degradación, reteniendo el 50% de su cantidad total inicial a los 41 DDS. Este estudio demostró que el BAP retrasa la degradación varios de los elementos de la maquinaria fotosintética como; chl a, Chl b, x+c, población de plastidios, proteínas solubles y la LSU de Rubisco asociado a altos potenciales hídricos y altas tasas de asimilación de CO<sub>2</sub>.

**Palabras clave:** población de plastidios, clorofila, LSU de Rubisco,  $\Psi_A$ ,  $\Psi_s$ ,  $\Psi_t$ ,  $g_s$ , tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>

## ABSTRACT

Natural leaf senescence of *Triticum aestivum* cv. Temporalera was retarded by aspersions of 6-bencilaminopurine (BAP) 0.1 mM every 3 days, during 20 days in a greenhouse. Leaf senescence of control leaves (water) was characterized by the lost of chlorophylls (88%) and soluble proteins (96%), as well as by a reduction of the plastid population (52.5%) at the 41 days after sowing (DAS). Xanthophyll and carotenoid concentration were reduced in 53.9%,

the rate of CO<sub>2</sub> assimilation reduced in a 94%, which was significantly correlated to the degradation of the Rubisco protein (LSU). The water potential ( $\Psi_w$ ) decreased of -0.38 MPa to -0.62 MPa during senescence, the osmotic potential ( $\Psi_s$ ) increased from -1.3 MPa to -1.1 MPa, associated to a loss of cells turgor. In contrast BAP maintained significantly higher the plastids population (74.5%), retained 75.7% of total chlorophyll and the 50% of soluble proteins. These cytokinin also promoted high  $\Psi_w$  with respect to the controls, diminishing in 20% (- 0.48 MPa) respect to the initial or green stage; increased the  $\Psi_s$  from -1.0 MPa to -1.10 MPa; the  $\Psi_t$  were significantly higher than their respective controls between 31 to 41 DAS. The stomatal conductance ( $g_s$ ) stayed in 68% (864.9 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) respect to initial value (1272 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). The CO<sub>2</sub> assimilation rate (4  $\mu$ mol of CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) did not show significantly different values from those of the green pre-senescent stage at the 41 DAS. The protein LSU of Rubisco delayed its degradation, retaining 50% of its initial amount to 41 DSA.

This study demonstrated that BAP delayed the degradation of various elements of the photosynthetic machinery as: chl *a*, Chl *b*, x+c, plastid population, soluble protein and LSU of Rubisco associated to high water potential and high rate of CO<sub>2</sub> assimilation.

**Key words:** Plastids population, chlorophyll, LSU of Rubisco,  $\Psi_w$ ,  $\Psi_s$ ,  $\Psi_t$ ,  $g_s$ , rate of CO<sub>2</sub> assimilation.

## 1. INTRODUCCIÓN

El principal propósito de la senescencia en las plantas es la movilización y reciclaje de nutrientes que las hojas ya no necesitan y que el fruto o semilla requieren para su desarrollo. Se ha demostrado experimentalmente que la senescencia es reversible (Thomas y Donnison, 2000; Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999a). Las aplicaciones externas de ciertos reguladores de crecimiento durante la senescencia, como las citocininas, promueven en los cloroplastos re-diferenciación, síntesis de proteínas y la reanudación de la actividad fotosintética (Paramonova *et al.*, 2002).

La senescencia puede ser inducida prematuramente por condiciones ambientales; ciertas partes de las plantas pueden ser sacrificadas para incrementar las oportunidades de supervivencia. Durante el ataque de un patógeno, la planta elimina la hoja dañada por medio de la senescencia, permitiéndole mover sus nutrientes y evitar el desarrollo del patógeno. Otro tipo de estrés es el ambiental, producido por radiación ultravioleta e incremento en la concentración de ozono, que ocasionan senescencia prematura resultando en el amarillamiento de las hojas. La senescencia como síntoma es también causada cuando las partes verdes de las plantas son removidas y almacenadas originando el amarillamiento poscosecha y la pérdida de nutrientes en los vegetales dando como resultado grandes pérdidas económicas (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Senescencia foliar

La senescencia de la hoja es considerada como un resultado de la interacción de factores internos y externos. Las células sufren cambios estructurales, metabólicos y genéticos que causan una marcada disminución en la capacidad fotosintética (Smart, 1994; Chandlee, 2001; Yoshida, 2003). La senescencia foliar constituye una secuencia de eventos estructurales, bioquímicos y fisiológicos genéticamente regulados, que comprenden el último estadio de desarrollo de la hoja, desde la madurez hasta la muerte (Thomas y Stoddart, 1980; Smart, 1994). Actualmente la senescencia es considerada un tipo de muerte celular programada conocida como PCD por sus siglas en inglés (programmed cell death) (Smart, 1994; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003).

Durante este proceso se expresan un conjunto de genes conocidos como SAGs (senescence associated genes), que tienen una mayor expresión y codifican para proteínas involucradas en la degradación celular, incluyendo ribonucleasas, preteasas, e hidrolasas entre otras (Biswal y Biswal, 1999). Durante la senescencia, los constituyentes celulares son degradados o desmantelados en un orden programado. Uno de los primeros eventos es la degradación de la clorofila, la cual es visible por el amarillamiento de las hojas; la degradación de proteínas y de RNA son paralelos a la pérdida de actividad fotosintética, moléculas como el nitrógeno, fósforo, iones metálicos y minerales son transportados fuera de la hoja senescente hacia tejidos en crecimiento como semillas y tallos (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). Durante la

senescencia existe una disminución en la integridad funcional de las membranas celulares, la cual se pierde progresivamente, causada por una degradación de proteínas y una oxidación de lípidos (Thompson *et al.*, 1998). La fosfolipasa D, fosfatasa y lipoxigenasa están implicadas en la degradación de las membranas; la expresión de los genes que codifican para estas enzimas se incrementan en tejidos senescentes (He y Gan, 2002).

### **2.1.1 Regulación génica de la senescencia foliar**

Estudios bioquímicos y moleculares han demostrado que la senescencia es un proceso que requiere la expresión de genes y la síntesis de nuevas proteínas (Noodén *et al.*, 1997; Chandlee, 2001). Durante este proceso ocurre una expresión génica diferencial, debido a que un grupo de genes conocidos como SDGs (senescence down-regulated genes) reducen su expresión durante la senescencia (Buchanan-Wollastone *et al.*, 2003; Yoshida, 2003). Los SDGs codifican para proteínas involucradas en la fotosíntesis; entre ellos se encuentran al gen CAB que codifica para la LHCP-2 y el gen *SSU* para la pequeña subunidad Rubisco. Durante la senescencia se expresan un grupo mayor de genes conocidos como SAGs (senescence associated genes), que codifican enzimas degradadoras como RNAasas, proteinasas y lipasas; así como proteínas involucradas en los procesos de translocación de nutrientes. La expresión de genes SAGs en células de las hojas es requerida para que se inicie el envejecimiento; sin embargo, este proceso puede ser bloqueado por inhibidores de RNA, síntesis de proteínas y enucleación (Gan y Amasino, 1997).

### 2.1.2 Degradación de clorofila

El amarillamiento de hojas senescentes se debe a la degradación de las clorofilas en el cloroplasto y a una retención parcial de carotenoides, éste es el primer síntoma de la transición a gerontoplastos. Éste término distintivo, es correctamente usado para esta forma específica de plastidio ya que el metabolismo de los gerontoplastos en contraste a todas las otras formas de plastidios es solamente catabólico (Matile *et al.*, 1999).

Las rutas de degradación de los pigmentos clorofílicos se pueden explicar de la siguiente manera (Figura 1):

En principio la clorofilasa cataliza la conversión de clorofila *a* a clorofilide y separa la cadena fitol de la molécula. La clorofilasa actúa preferencialmente sobre la clorofila *a* pero también acepta clorofila *b* a través de una interconversión de *b* a *a* y feofitinas. Posteriormente ocurre una dequelación del magnesio en la cuál, una enzima que se encuentra asociada a la membrana cloroplástica remueve el  $Mg^{+2}$  mediante una sustancia metal-quelante (MCS) para formar feoforbide *a* (Hörtensteiner, 2006).

La especificidad de feoforbide *a* oxigenasa (PAO) por feoforbide *a* genera una serie de catabolitos clorofílicos rojos conocidos como (RCCs), los cuales son reducidos por la RCCreductasa y los convierte en pFCC (precursores de catabolito fluorescente de clorofila) (Hörtensteiner, 2006). Los pFCCs se modifican para dar lugar a los FCCs, los cuales se localizan en los gerontoplastos y que posteriormente son depositados en la vacuola. Los FCCs se conocen como catabolitos intermediarios los cuales finalmente serán convertidos a NCCs. La localización vacuolar de los NCCs y la analogía

química de la reacción de las hidroporfirinas sugieren una reacción no enzimática dentro de condiciones ácidas. Se sabe que a un pH ácido, los pFCC-2 rápidamente se convierten a NCC (Matile *et al.*, 1999). Los mecanismos involucran probablemente dos pasos, una protonación y una desprotonación que conduce a la formación de NCC inestables (Figura 1).

La enzima *Feoforbide a oxigenasa* probablemente es la causante de la degradación de la clorofila, se sabe que esta enzima se acumula en grandes cantidades durante la senescencia foliar (Matile *et al.*, 1999). La enzima se une a los anillos tetrapirrólicos para producir RCC que mas adelante serán convertidos a NCCs (Hörteinsteiner *et al.*, 1998). Los productos finales del catabolismo clorofílico son depositados en la vacuola, de donde no será reciclado el nitrógeno contenido dentro de ellos (Hinder *et al.*, 1996; Tommasini *et al.*; 1998). Los RCCs causan rápida muerte celular ya que no existe la enzima que degrade la clorofila fitotóxica



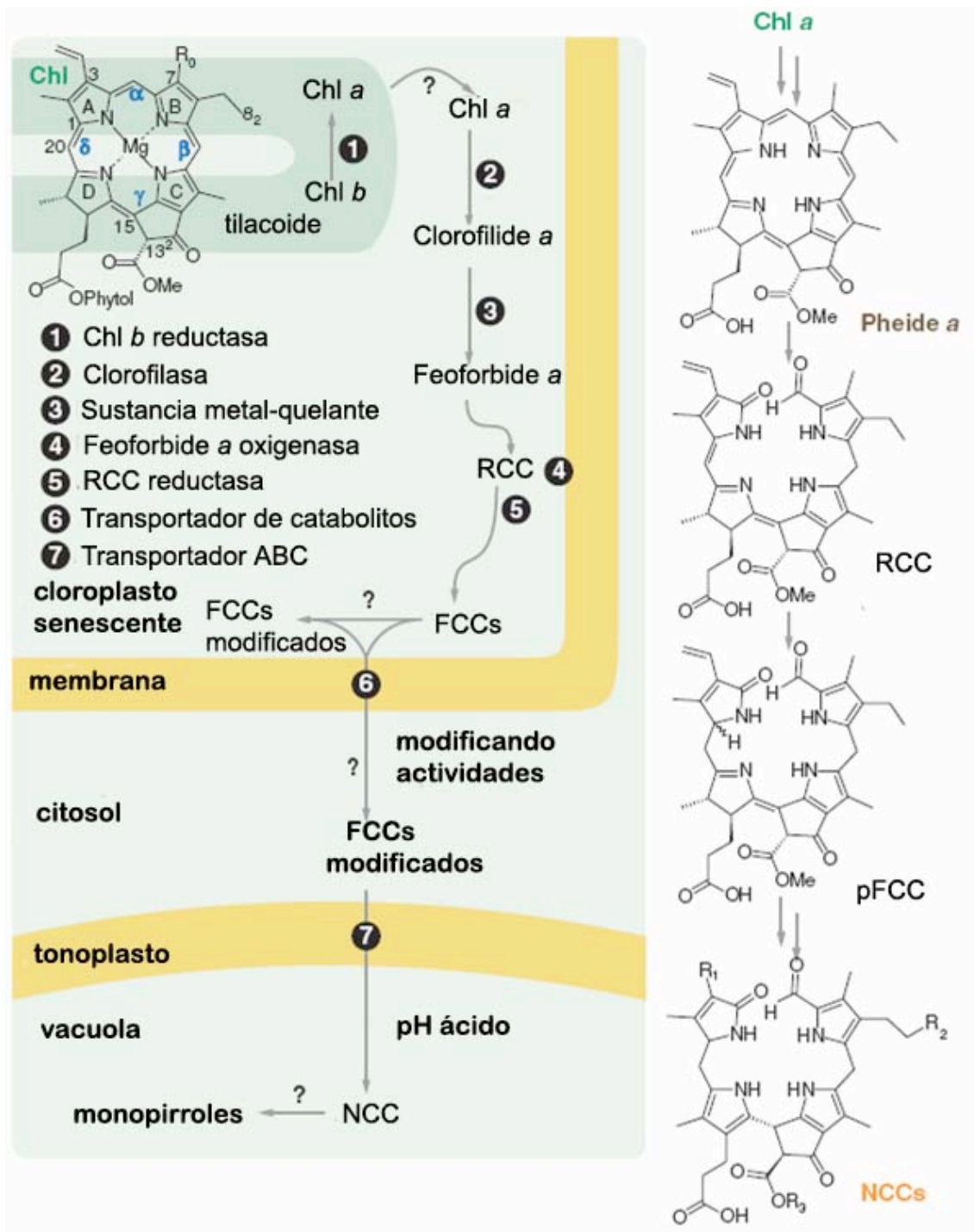


Figura 1. Degradación de la clorofila (Hörtensteiner, 2006)

### 2.1.3 Degradación de proteínas cloroplásticas

Cerca del 75% de la proteína que se encuentra en el cloroplasto es degradada y removilizada (Buchanan-Wollastone *et al.*, 2003). Muchos genes que codifican para proteasas se expresan durante la senescencia, pero estos al parecer codifican para enzimas que se encuentran en la vacuola y por lo tanto no tienen contacto directo con las proteínas cloroplásticas (Buchanan-Wollastone *et al.*, 2003). Existen estudios que demuestran que, las primeras proteínas estromales en degradarse son Rubisco y glutamina sintetasa. Esta degradación se produce por un grupo de moléculas conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS), que se han encontrado en cloroplastos incubados en condiciones de estrés foto-oxidativo (Ishida *et al.*, 1999, 2002; Roulin y Feller, 1998). Sin embargo, aún no es claro si el incremento de ROS podría iniciar una degradación temprana de Rubisco durante la senescencia.

Estudios con cloroplastos demostraron actividad de aminopeptidasas y metaloendopeptidasas; así como la presencia de proteínas ClpP y ClpC miembros de la familia de proteasas (Shanklin *et al.*, 1995; Roulin y Feller, 1998; Majeran *et al.*, 2000). Estas enzimas (ClpP y ClpC) tienen un papel fundamental en la síntesis de proteínas durante el desarrollo de las hojas, pero no hay evidencias claras de que también participen en la degradación de proteínas durante la senescencia (Shikanai *et al.*, 2001).

La LHCP II es otra proteína importante que se degrada durante la senescencia. La degradación requiere de la liberación de pigmentos asociados a la proteína con los que forma complejos (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). El primer paso es la remoción de los catabolitos clorofílicos, los cuales

desestabilizarán el complejo, permitiendo la intervención de proteasas (Yamada *et al.*, 2001).

La vía de la ubiquitina en la degradación de proteínas es importante; debido a que durante la senescencia se incrementa la expresión de *SEN3* que codifica para la poliubiquitina en *Arabidopsis* (Park *et al.*, 1998), molécula importante que participa en la degradación de proteínas no cloroplásticas (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003).

El polipéptido de 32 kDa del fotosistema- II ( $Q_B$ ) se degrada mas rápidamente durante la senescencia que la mayoría de las proteínas cloroplásticas (Roberts *et al.*, 1987). En contraste la proteína D1 no se degrada y continúa a través de la senescencia en hojas de frijol; mientras que los niveles de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la ATPasa, la proteína 68 kDa del fotosistema- I, citocromo *f*, citocromo  $b_6$  y LHCP disminuyen en forma importante (Roberts, 1987). Estudios en trigo revelaron que la disminución en la cantidad de transcritos de la subunidad pequeña de Rubisco (*rbcS*) están asociados con el inicio de la senescencia (Fischer y Féller, 1994).

#### **2.1.4 Senescencia del cloroplasto**

El cloroplasto sufre cambios drásticos a nivel estructural y fisiológico durante el envejecimiento foliar. Los cloroplastos senescentes no pueden dividirse y son incapaces de llevar a cabo alguna actividad biosintética (Thomson y Platt-Aloia, 1987). Aunque un número limitado de proteasas se han identificado en el cloroplasto, aún no se conocen todos los mecanismos de degradación y envejecimiento de estos organelos. Investigaciones sobre el

genoma de los plastidios revelaron que varias proteasas están localizadas en estos y podrían ser las responsables de su desmantelamiento (Sakamoto, 2006). Las proteasas más importantes son las dependientes de ATP como la Clp (Clorofil-proteasa), FtsH y Lon que son consideradas como las principales enzimas involucradas en los procesos de degradación de proteínas cloroplásticas, proceso que inicia con la degradación de oligopéptidos y luego de aminoácidos (Sakamoto, 2006). La arquitectura básica de las proteasas dependientes de ATP es muy similar a la de las enzimas bacteriológicas como la de *Escherichia coli*, pero las enzimas plastídicas aparentemente tienen un número extraordinario de isoformas. Estudios moleculares en *Arabidopsis* proponen diferentes funciones de estos isómeros dentro de la degradación del cloroplasto (Sakamoto, 2006).

La ultraestructura de los cloroplastos también se ha estudiado durante el proceso de senescencia en hojas de *Festuca pratensis* (Thomas, 1977), *Hordeum vulgare* (Martinoia *et al.*, 1983), *Oryza sativa* (Hashimoto *et al.*, 1989), *Glycine max* (Guiamét y Giannibelli, 1994), *Nicotiana rustica* (Zavaleta *et al.*, 1999b) y *Triticum aestivum* (Vičková *et al.*, 2006). Los procesos de envejecimiento del cloroplasto se han estudiado en relación a factores ambientales que aceleran la senescencia como el déficit de agua (Paramonova *et al.*, 2002), la luz continua y oscuridad (Vičková *et al.*, 2006).

Los cambios estructurales del cloroplasto durante la senescencia inician con una reducción de la población de polirribosomas, desorganización y degradación de los tilacoides, seguido de un aumento en tamaño y número de

plastoglóbulos y finalmente la ruptura de la envoltura cloroplástica (Biswal y Biswal, 1988; Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999b; Paramonova, 2002).

La degradación de las membranas tilacoidales esta relacionada con la formación de plastoglóbulos, se piensa que estos cuerpos osmiofílicos están formados por lípidos, productos de la degradación lamelar; en algunos estudios se encontró que los carotenoides liberados de los tilacoides se esterifican y se depositan en los plastoglóbulos durante la senescencia de *Fagus sylvatica* (Tevini y Steinmüller, 1985)

La mitocondria y el núcleo aparecen todavía como estructuras intactas hasta un avanzado estadio de senescencia, aún cuando las hojas están completamente amarillas. Posteriormente, la membrana de la vacuola se fragmenta y finalmente el núcleo se dilata y desintegra (Biswal y Biswal, 1988).

La retención de la envoltura cloroplástica y membrana plasmática sugiere la participación de un sistema de membranas en el transporte de productos degradados a otras células (Woolhouse, 1984).

#### **2.1.5 Ribulosa 1-5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco)**

La ribulosa-1-5-bifosfato carboxilasas/oxigenasa (Rubisco), existe en forma de heteropolímero con ocho subunidades grandes idénticas de unos 55 kDa (LSU) cada una (codificadas por un gen del cloroplasto) y ocho subunidades pequeñas idénticas de 14 kDa (SSU) cada una (codificadas por un gen nuclear), lo que hace un total de unos 560 kDa para toda la enzima. En cada una de las subunidades grandes existe un sitio activo que une los

sustratos de Rubisco y  $\text{CO}_2$ , así como el activador  $\text{Mg}^{2+}$ , aunque de alguna forma las subunidades pequeñas también son esenciales para la actividad catalítica de la enzima (Parry *et al*, 2002). La Rubisco cataliza el primer paso en la fijación del  $\text{CO}_2$ . Su activación requiere de un pH 8 para el transporte de  $\text{H}^+$  del estroma hacia los canales tilacoidales, también requiere de la enzima Rubisco activasa, ATP y  $\text{Mg}^{2+}$  para maximizar la carbamilación de moléculas de  $\text{CO}_2$ . La rubisco activasa funciona en luz, por que probablemente así este disponible el ATP proveniente de la fosforilación, pero en oscuridad la Rubisco se descarbamila de manera espontánea y pierde su función (Spreitzer y Salvucci, 2002).

Seeman *et al.* (1985), encontraron que en algunas especies de plantas existe un inhibidor de la Rubisco, un compuesto de seis carbonos 1-fosfato 2-carboxiarabinitol, (CA1P), que se activa durante la noche y se inactiva durante el día por la acción de una fosfatasa. El CA1P se une con fuerza a la Rubisco e inhibe su actividad durante la noche, pero durante el día una enzima conocida como Rubisco activasa se une al CA1P inhibiendo su actividad y promoviendo la carbamilación de la Rubisco.

## **2.2 Citocininas**

### **2.2.1. Estructura y lugares de síntesis**

Las citocininas son reguladores de crecimiento naturales y artificiales, derivadas de la adenina que presentan un anillo de purina y pueden ser clasificadas por la configuración de su cadena lateral  $\text{N}^6$ , de donde proviene su nombre. Se distinguen por su habilidad de promover la división celular (Mok y

Mok, 2001). A mediados del siglo pasado en 1955, se descubrieron las citocininas entre ellas la cinetina, un compuesto aislado del ADN de arenque que promovía la división celular (Miller *et al.*, 1955; Amasino, 2005), más tarde un gran número de compuestos con actividad parecida a las citocininas fueron identificados, entre ellos trans-zeatina (tz) como una citocinina natural, difenilurea como una citocinina sintética y otras citocininas naturales con cadenas aromáticas (Inoue *et al.*, 2001).

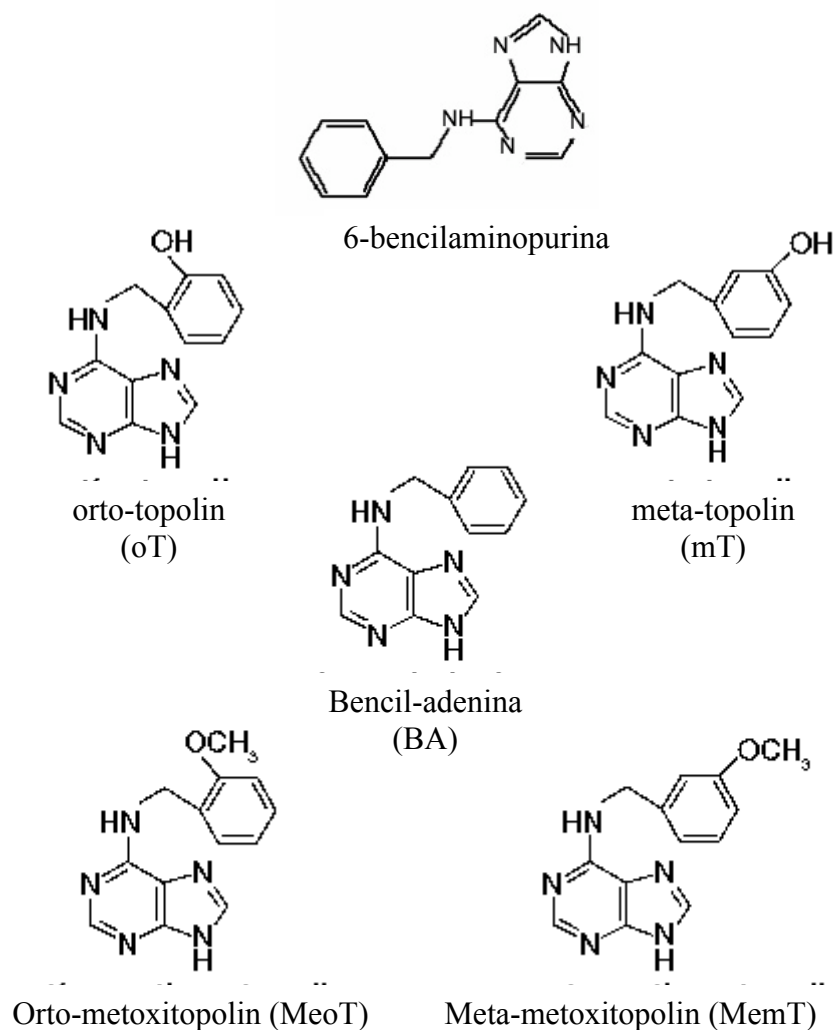
Las citocininas son sintetizadas principalmente en las puntas de las raíces y en los ápices de nuevos retoños. Investigaciones revelaron la presencia de citocininas en los cloroplastos (Sakakibara *et al.*, 2005). Las citocininas tienen funciones coordinadas como mensajeros y actúan en varios órganos de las plantas, aunque la diferenciación fisiológica y los mecanismos duales de señales aún no son conocidos completamente (Kakimoto, 2003; Mok, 2001).

Los mecanismos moleculares de su biosíntesis, señales de transducción han sido poco estudiados. Varias enzimas y proteínas se han descrito como partícipes en la ruta de biosíntesis en las citocininas (Sakakibara, 2006).

Se han identificado genes codificadores de enzimas y proteínas que regulan ciertos pasos en la ruta biosintética de las citocininas; entre ellos se encuentra la IPT (isopentenil transferasa). El efecto biológico de las citocininas, también está regulado por otros fitorreguladores de crecimiento y nitrógeno inorgánico (Sakakibara *et al.*, 2005).

Las citocininas aromáticas e isoprenoides se encuentran de manera natural en las plantas, la concentración puede variar de acuerdo a la especie;

las citocininas naturales mas comunes son *N*6-(2-isopentenil)-adenina (iP), tZ, *cis*-zeatina (cZ), y dihidrozeatina (DZ) (Figura 2). Las citocininas tZ y la iP son las principales formas en *Arabidopsis*; mientras que, cantidades considerables de cZ se encuentran en maíz garbanzo y arroz (Veach *et al.*, 2003). Las citocininas aromáticas como *ortho*-topolin (oT), *meta*-topolin (mT), y sus derivados-metoxo (meoT y memT) respectivamente así como la benciladenina (BA) son encontradas únicamente en algunas especies de plantas (Strand, 1997).





**Figura 2.** Estructura de algunas citocininas naturales y sintéticas (Sakakibara, 2006).

### **2.2.2 Actividad biológica de las citocininas**

Las citocininas tienen una función importante, regulan la proliferación y diferenciación de las células vegetales, participan en varios procesos de crecimiento y desarrollo en las plantas, como en el control de la senescencia (Gan y Amasino, 1995; Mok, 1994). Controlan el balance entre la raíz y tallo, transducen señales nutrimentales y favorecen la productividad de algunos cultivos importantes (Samuelson y Larsson, 1993; Takei *et al.*, 2001; Sakakibara, 2005). Las citocininas tienen una función importante en el desarrollo de la semilla en tabaco, yemas laterales, crecimiento del embrión, así como la ganancia de peso seco de la semilla madura (Ma *et al.*, 2002). Las citocininas participan y regulan diferentes procesos fisiológicos, bioquímicos y de desarrollo en la planta; estas moléculas pueden promover la división y alargamiento celular, diferenciación de plastidios, desarrollo de yemas laterales, retraso de la senescencia, movilización de nutrimentos, desarrollo floral, germinación de semillas entre otros (Taiz y Zeiger, 1998; Schmülling *et al.*, 1997).

### **2.2.3 Biosíntesis de la citocininas**

Existen algunas rutas para la biosíntesis de iP riboside 5-monofosfato (iPRMP) en plantas superiores en la cuales se asume que genes de la familia IPT participan en la biosíntesis citocininas. Se han encontrado un determinado número de genes IPT en *Arabidopsis* (Takei *et al.*, 2001), petunia (Zubko *et al.*,

2002), entre otras (Sakano *et al.*, 2004). En *Arabidopsis*, los genes *IPT* (*AtIPT1* y *AtIPT3*, *AtIPT8*) son los que están involucrados directamente en la biosíntesis de citocininas. Las citocininas presenta un grupo de nucleobases que contienen un nucleótido y glicósido correspondiente que se encuentran de forma activa (Sakakibara, 2006).

Los nucleósidos de las citocininas pueden ser convertidos a nucleótidos tZ por CYP735A, iP, tZ. Los nucleósidos pueden ser catabolizados por CK a adenina (Ade) ó adenosina (Ado) o a *N*-glucosido por CK *N*-glucosiltransferasa (CK-N-GT). Mientras que cZ y tZ pueden ser interconvertidos por la zeatin cis-trans isomerasa. tZ u O-glucosido por la zeatina O-glucosiltransferasa (ZOGT) y  $\beta$ -glucosidasa ( $\beta$ Glc) precursores de citocininas con mayor actividad (Sakakibara, 2006).

#### **2.2.4 Retraso de la senescencia foliar**

Las hormonas de las plantas son importantes, por que modulan muchos procesos fisiológicos y bioquímicos. El etileno y el ácido absícico (ABA), son estimuladores; mientras que, las citocininas son consideradas como un potente inhibidor de la senescencia (Noodén, 1988). Actualmente se reconoce el hecho de que las citocininas tienen un papel preponderante en el control de la senescencia foliar (Noodén 1988; Gan y Amasino, 1996). Se sabe que aplicaciones externas de citocininas a hojas en varias especies retrasan la senescencia foliar (Venkatarayappa *et al.*, 1984; Noodén, 1988; Gan y Amasino, 1996). La senescencia foliar puede retrasarse por la actividad de citocininas o inhibición del etileno. Estudios en plantas de tabaco que expresaron la

biosíntesis del gen *IPT* permanecieron por más tiempo verdes que las plantas que no expresaron el gen (Gan y Amasino, 1995); en este experimento, todos los procesos bioquímicos que ocurren durante la senescencia como la degradación de clorofila, proteínas y disminución de la actividad fotosintéticas en las plantas transformadas se retrasaron. Esto demostró que el proceso de senescencia se retrasó en estadios tempranos.

Plantas de tabaco transgénicas, en las cuales se expresó el gen homeobox de maíz *knotted1*, presentaron un fenotipo similar a las silvestres, pero incrementaron sus niveles de citocininas en hojas senescentes; en contraste, las no transformadas presentaron bajos niveles del fitorregulador (Ori *et al.*, 1999). Sin embargo, aún no se explican el hecho de que el gen *knotted1*, el cual de manera normal se expresa durante el desarrollo de los meristemas se encuentre presente en las hojas y participe como un regulador de la senescencia.

Estudios en petunia mostraron que pueden encontrarse genes como *Sho* similares al *IPT* de *Arabidopsis*, el cual codifica para la síntesis de citocininas (Zubko *et al.*, 2002). En *Arabidopsis* se sabe que una sobre-expresión de una enzima farnesil difosfato sintasa (*FPS*) que participa en la ruta del mevalonato promueve la senescencia, debido a que la sobreproducción de *FPS* conduce a una reducción del sustrato necesario para la biosíntesis de las citocininas y consecuentemente provoca una disminución en los niveles, manifestando en la hoja los síntomas de senescencia temprana y la expresión de genes *SAGs* (Masferrer *et al.*, 2002).

El etileno es esencial para la maduración de muchos frutos, pero también se demostró que participa en los procesos de senescencia en algunas especies de plantas (Buchanan-Wollastone *et al.*, 2003). Estudios en plantas expuestas al etileno presentaron síntomas de senescencia temprana acelerando el amarillamiento de las hojas. Experimentos con mutantes de *Arabidopsis* insensibles al etileno (*Etr1*) retrasaron la senescencia (Grbic y Bleecker, 1995); resultados similares se observaron en plantas transformadas de tomate, las cuales sintetizaban bajos niveles de etileno (Picton *et al.*, 1993). El retraso de la senescencia ocurre principalmente en mutantes por los bajos niveles de etileno producidos, pero una vez iniciado el proceso continúa normalmente. El etileno es un modulador del proceso de senescencia y su presencia podría acelerarla, pero no es esencial para que la senescencia ocurra (Buchanan- Wollastone *et al.*, 2003).

Existen estudios que demuestran el efecto rejuvenecedor de la citocinina BAP en hojas senescentes de *Nicotiana rustica* induciendo la recuperación de la estructura del cloroplasto, resultado de la re-diferenciación de los gerontoplastos (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999b). Esta regeneración estuvo acompañada de biosíntesis de clorofila e inducción de la enzima protoclorofilide oxidoreductasa (POR), así como del aumento paralelo de la proteína LHCP-2, y actividad fotosintética (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999a).

Plántulas de lechuga (PSAG12-IPT) fueron transformadas y se encontró que existía un ligero control en la plántula mediado por citocininas, rasgo que también fue observado en tabaco (McCabe *et al.*, 2001).

## 2.3 Senescencia y relaciones hídricas

### 2.3.1 Potencial hídrico y sus componentes

El término de potencial hídrico ( $\Psi_A$ ), fue propuesto por Slatyer y Taylor en 1960. El término de  $\Psi_A$  es una medida del estatus de la energía libre del agua y es aplicada a las células de las plantas.

La ecuación completa que incluye todos los factores, los cuales podrían influir en el  $\Psi_A$  fue dada por Turner (1981). Estos factores se describen a continuación:

$$\Psi_A = \Psi_s + \Psi_t + \Psi_m + \Psi_g$$

El potencial osmótico ( $\Psi_s$  o  $\pi$ ) es el componente producido por solutos disueltos en el citoplasma, principalmente la savia vacuolar.

El potencial de turgencia ( $\Psi_t$ ), es la presión producida por la difusión del agua dentro del protoplasto de las células delimitado por las paredes y otros componentes celulares; éste es el responsable de la expansión celular; además de que mantiene la forma de los tejidos. La pérdida de turgencia celular propicia el marchitamiento en las plantas (Kramer, 1983; Taíz y Zeiger, 1998).

El potencial mátrico ( $\Psi_m$ ), se refiere al agua retenida en microcapilares sobre la superficie de las paredes celulares u otros componentes. El efecto de la gravedad ( $\Psi_g$ ), es un término de insignificante importancia dentro de una raíz u hoja, pero llega a ser importante en comparación con otros potenciales en hojas que se encuentran a grandes alturas en los árboles y su relación con el suelo (Kramer, 1983).

El  $\Psi_s$  y  $\Psi_m$ , son negativos,  $\Psi_s$ , expresa el efecto de solutos en solución de la célula y  $\Psi_m$  expresa el efecto de la unión del agua con los coloides

superficies y la capilaridad en las paredes celulares y las células. Sin embargo, en el xilema el  $\Psi_p$  puede ser negativo durante la transpiración o positivo en la gutación de las plantas como resultado de la presión en la raíces. La suma de estos tres términos es un número negativo, excepto cuando las células están completamente túrgidas puede llegar a cero. Cuanto mas bajo es el  $\Psi_A$ , mayor es el estrés en la planta (Kramer, 1983).

### **2.3.2 Citocininas y las relaciones hídricas**

La senescencia puede ser inducida por patógenos, luz, oscuridad, translocación de nutrientes, hormonas, así como por déficit de agua. La acumulación de ABA en las hojas de plantas que están expuestas a un continuo déficit hídrico, afecta los movimientos estomáticos induciendo su cierre lo que a su vez reduce la tasa de transpiración, el transporte de solutos hacia las partes aéreas de la planta y la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$ , proceso que ocurren de manera natural durante la senescencia (Kramer, 1989; Chandlee, 2001).

Se ha confirmado que la secuencia de eventos que ocurren durante la senescencia foliar en plantas monocárpicas, es la misma que cuando se somete a las plantas a un déficit moderado de agua (-70 kPa y -80 kPa). Este déficit moderado de agua es el que comúnmente se observa en condiciones de campo, el cual afecta la arquitectura de la planta (reflejándose en la reducción del tamaño de la hoja, incremento de la densidad de tricomas, disminuyendo el tamaño de los estomas) y el flujo de agua sin un apreciable efecto en el estatus

hídrico de la planta (Pic *et al.*, 2002). La senescencia promovida por estrés hídrico es acompañada por una remobilización de las reservas. En arroz, la senescencia foliar producida por déficit hídrico, promueve la distribución de asimilados para el llenado del grano, reduciendo el tiempo de llenado (Yang *et al.*, 2002).

El alargamiento celular depende particularmente de la turgencia celular; en el tallo y hojas la elongación se acelera o disminuye por déficit de agua. Una disminución del contenido de agua inhibe la tasa fotosintética y usualmente reduce la tasa de respiración y otros procesos enzimáticos (Kramer, 1983).

Las plantas por lo general están sometidas a periodos de déficit de humedad en el suelo y/o atmósfera durante su ciclo de vida, dependiendo de su severidad pueden producir cambios morfológicos y metabólicos (Chávez, 2002), dentro de estos cambios se encuentran la disminución del número y tamaño de hojas, tamaño y cierre de estomas, ajuste osmótico, reducción del intercambio de gases, inhibición parcial de los reguladores de crecimiento como ABA y alteración del metabolismo nitrogenado junto con reducción de turgencia lo que provoca la reducción de crecimiento (Kramer, 1989; Tanaka *et al.*, 2006).

El intercambio de CO<sub>2</sub> y vapor de agua entre la planta y el ambiente es regulado en periodos cortos, por el ajuste de la capacidad fotosintética y cambios en la apertura estomática por periodos prolongados, mediante cambios en el área foliar y el desarrollo de un aparato fotosintético en el mesófilo. A medida que el déficit de agua progresa, disminuye la fotosíntesis antes que la respiración y como consecuencia el índice tasa fotosintética / transpiración disminuye (Nilsen y Orcutt, 1996).

La sequía reduce la incorporación de aminoácidos en la Rubisco y disminuye la actividad reductasa del nitrato en la hoja por una reducción del flujo del nitrato (Ortiz-López *et al.*, 1991). En plantas de *Panicum* sujetas a ciclos cortos de agua y provocando un estrés en el suelo entre 25 y 55% ( $\psi_A - 15$  a  $0.1$  bar) se mostró un acelerado envejecimiento en hojas maduras (Thomas y Stoddar, 1980).

Las citocininas antagonizan muchos procesos fisiológicos inducidos por la pérdida de agua, principalmente los que son mediados por el ácido absísico. La adición de BAP a plantas crecidas *in vitro* estimula la apertura estomática y la transpiración (Pospíšilová *et al.*, 1998). El mecanismo de acción de las citocininas sobre las células oclusivas podría involucrar un cambio eléctrico en membrana a través de una hiperpolarización electrogénica ( $H^+$ ), así como una estimulación en la actividad del adenilato ciclasa, guanilato ciclasa o interactuando directamente con el sistema calcio-calmodulina, regulando canales iónicos permeables a ABA (Incoll *et al.*, 1990).

Existen pocos estudios del efecto de las citocininas sobre los parámetros fotosintéticos y potencial hídrico, estos se han relacionado con la pérdida de agua debido al estrés hídrico o a la senescencia. Sin embargo, sólo se sabe que las citocininas promueven un rápido incremento en el potencial de agua. En *Phaseolus vulgaris* cuando es sometido a déficit hídrico y posteriormente regado con agua y asperjado con citocininas, el potencial hídrico se incrementa rápidamente alcanzando los niveles de las plantas control (regadas con agua), pero aún no se saben los mecanismos de acción en estos procesos (Rulcová y Pospíšilová, 2001).



### **2.3.3 Factores que intervienen en la pérdida de agua foliar**

Existen diferentes factores por los cuales la hoja pierde agua y por lo tanto disminuye muchas de sus actividades fisiológicas y bioquímicas que dependen de agua. Uno de estos factores es la evaporación de agua de las paredes celulares y su difusión fuera de las hojas, principalmente a través de los estomas, estos términos pueden ser discutidos en términos de resistencia y conductancia estomática y conducción de fuerzas (Kramer, 1983; Taíz y Zeiger, 1998).

El agua proviene de la raíz difundiéndose por los espacios intercelulares y se pierde por los estomas. Cuando estos se cierran, la única vía disponible es a través de las células epidérmicas y la cutícula, siendo ésta una ruta en la cual se genera una gran resistencia (Kramer, 1983).

Una presión positiva del xilema causa exudación de savia a través de los hidátodos, que son estructuras localizadas cerca de las traqueidas terminales cercanas a los márgenes de las hojas. Las gotas de rocío que comúnmente se ven en la mañana en el pasto son exudados de estos poros especializados. La gutación es más notable cuando la transpiración es suprimida y la humedad relativa es alta, como ocurre en la noche (Taíz y Zeiger, 1998).

La transpiración de la hoja depende de dos factores principalmente: (1) la diferencia en la concentración de vapor de agua entre la hoja y los espacios de aire y aire externo y (2) la resistencia de difusión controlada por la resistencia estomática y la capa de frontera (Taíz y Zeiger, 1998)

El índice de transpiración depende de la energía necesaria para convertir al agua en vapor, el gradiente en la presión de vapor o concentración que constituye la fuerza conductora (driving force) y la magnitud de la resistencia de esta vía (Lawlor, 2002).

La transpiración difiere de la evaporación, por que el escape de vapor de agua de las plantas es controlado por la resistencia de la hoja que no esta involucrada en la evaporación de una superficie libre de agua (Kramer, 1983).

Existen factores que pueden alterar la tasa de transpiración en la planta como la humedad relativa, temperatura, resistencia estomática, velocidad del viento, y potencial de agua. Las hojas también pueden influir de manera directa por su tamaño, forma, características de la superficie y posición (Murchie *et al.*, 1999). Estas características afectan la absorción y reflexión de la luz, la temperatura de la hoja. Se sabe también que el área de las hojas es importante por que afecta de manera significativa la tasa fotosintética; además de que hojas con áreas muy grandes transpiran más que las que presentan áreas más pequeñas, debido a que tienen una mayor densidad de estomas (Kramer, 1983; Taíz y Zeiger, 1998).

El índice de transpiración es afectado por la orientación de las hojas, debido a que pueden exponerse en ángulos rectos exponiéndose mas a los rayos del sol y por lo tanto incrementan la tasa de transpiración (Murchie *et al.*, 1999); en contraste con las hojas que se encuentran en ángulos paralelos se exponen menos a los rayos del sol y por lo tanto transpiran menos (Kramer, 1983; Taíz y Zeiger, 1998).

Los estomas y la anatomía de la hoja son muy importantes en la transpiración de las plantas; la anatomía puede ser modificada por el ambiente y una de las evidencias puede ser el número de estomas así como el tamaño. La apertura y cierre de los estomas en plantas C3 y C4 está correlacionada con la intensidad luminosa, tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> y con la conductancia estomática (Parry *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2006).

#### **2.3.4 Senescencia y fotosíntesis**

Durante la senescencia foliar, uno de los eventos más importantes es el desensamblaje del aparato fotosintético dentro de los cloroplastos y por consiguiente la disminución de la actividad fotosintética (Grover y Mohanty, 1992; Gay y Thomas 1995). Esta pérdida de actividad está asociada con la degradación de la enzima Rubisco (Crafts-Brandner *et al.*, 1990; Parry *et al.*, 2002); lo que provoca una reducción en la tasa de fijación de CO<sub>2</sub>.

La actividad fotoquímica del PSII también disminuye, ocasionando fotodaño en los centros de reacción por una mala disipación de la energía. El exceso de energía excitada debe ser disipada en los complejos antena del PSII en forma de calor, a través de un proceso el cual involucra el ciclo de las xantofilas y un bajo pH en los tilacoides, pero durante la senescencia este proceso no ocurre (Lu *et al.*, 2001).

Durante la senescencia, para prevenir una muerte celular prematura y permitir una movilización adecuada de nutrientes de las hojas senescentes, el aparato fotosintético tiene que desmantelarse sistemáticamente lo cual requiere

una regulación metabólica temporal y espacial de la función fotosintética (Wingler *et al.*, 2004). La removilización de nitrógeno y fósforo son un importante recurso para el desarrollo de las plantas.

La movilización de nitrógeno de proteínas fotosintéticas tales como Rubisco, LHCP-2 producen una disminución en la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>. En *Arabidopsis*, la tasa fotosintética disminuye antes de que la hoja este completamente expandida, mientras que los niveles de clorofila permanecen altos después de estadios avanzados de desarrollo (Stessman *et al.*, 2002). Una combinación de altos niveles de clorofila y baja asimilación de CO<sub>2</sub> puede provocar un daño foto-oxidativo por el desbalance entre la energía capturada y disipada; por ejemplo se sabe que en los mutantes “siempre verdes” en soya, son más susceptibles a la fotoinhibición (Guiamét *et al.*, 2002).

Durante la senescencia foliar, el estrés oxidativo se incrementa con la edad de la hoja; para prevenir el daño foto-oxidativo que podría desencadenar una peroxidación de lípidos y muerte celular, el aparato fotosintético debe ser desmantelado de manera ordenada. En cotiledones de *Brassica napus* la actividad del fotosistema II disminuye antes que la del fotosistema I (Ghosh *et al.*, 2001) de esta forma evita un daño foto-oxidativo prematuro.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 General**

Analizar el efecto de la citocinina BAP en los niveles de Rubisco, fotosíntesis y transpiración, durante el retraso de la senescencia foliar natural de *Triticum aestivum* var. Temporalera

#### **3.2 Particulares**

- 1) Evaluar el efecto de la citocinina BAP en los niveles de Rubisco y en la fijación de CO<sub>2</sub> durante el retraso de la senescencia foliar natural en trigo.
- 2) Estudiar el efecto de la citocinina BAP en la población de plastidios, durante la senescencia y el retraso de esta.

- 3) Estudiar el efecto de la citocinina BAP en las relaciones hídricas ( $\Psi_A$ ,  $\Psi_s$ ,  $\Psi_t$ ), intercambio de gases ( $g_s$ , fijación de  $\text{CO}_2$ ) durante la senescencia foliar.

#### 4. HIPÓTESIS

- Si la citocinina BAP retrasa la senescencia foliar, entonces mantendrá los niveles de Rubisco y la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$ .
  
- Si la citocinina BAP retrasa la senescencia, entonces mantendrá la población de plastidios.
  
- Si la citocinina BAP retrasa la senescencia, entonces el equilibrio hídrico e intercambio de gases se mantendrán constantes.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Siembra y obtención del material biológico

Semillas de trigo (*Triticum aestivum* var. Temporalera) se desinfectaron sumergiéndolas durante 20 minutos en una solución al 3% de una mezcla de fungicidas y bactericidas (captan 15%, benlate 10%, tecno 10% y bactrol 10%). Para cada experimento se sembraron un promedio de 80 semillas en charolas de plástico de 33x28x13 cm conteniendo una mezcla de peat moss y agrolita (95v/5v). Las charolas se colocaron en un diseño completamente aleatorio, con tres repeticiones para cada experimento en un invernadero del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, localizado a 19° 29' latitud norte y 98° 54' longitud oeste y 2250 msnm, (García, 1988), con temperatura promedio en el invernadero durante el día (12h) de  $30 \pm 2$  °C y de  $8 \pm 4$  °C durante la noche. Las charolas se regaron con agua corriente cada tercer día durante todo el experimento. Las plántulas se dejaron crecer hasta la aparición de la segunda

hoja expandida con lígula expuesta, en promedio 21 días después de la siembra (DDS)

## 5.2 Soluciones BAP y control

Se utilizaron soluciones de 0.1 mM, 0.01 mM y 0.001 mM de 6-bencilaminopurina (BAP, Sigma) con 0.02 % dimetilsulfóxido (DMSO Sigma) usado para disolver el regulador de crecimiento y 0.02% de Tween 20 (Boehringer Mannheim GmbH) para facilitar la penetración del regulador de crecimiento. La solución control se preparó de la misma forma que la solución de citocinina pero sin el fitorregulador (Trevilla, 2004).

## 5.3 Cuantificación química de pigmentos fotosintéticos

Fragmentos (3cm) de la parte media de la segunda hoja se maceraron en 4ml de acetona al 80% (4 C). El extracto se centrifugó a 840 g durante 10 minutos y el sobrenadante se recuperó y ajustó a 4ml. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 470 nm, 646 nm y 663 nm en un espectrofotómetro (Cary Conc UV-Visible spectrophotometer). Las concentraciones de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), xantofilas y carotenoides (x+c) se calcularon empleando la fórmula de Lichtenthaler y Wellburn (1983):

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

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

$$C_{x+c} = \frac{1000 A_{470} - 3.27 \text{Chl}_a - 107 \text{Chl}_b}{229}$$

229



Los resultados obtenidos se expresados en  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso fresco (PF)

#### **5.4 Calibración del SPADmeter**

El SPADmeter determina la cantidad relativa de clorofila presente en la hoja, la medición se hace por la absorbancia de la hoja en dos longitudes de onda. La clorofila tiene dos picos de absorbancia, una en el rojo (400-500 nm) y otra en el azul (600-700 nm), con una no transmitancia en la región cercana al infrarrojo; por lo tanto, el SPADmeter mide la absorbancia de la hoja en el rojo y cerca de las regiones del infrarrojo. Usando las dos transmitancias el SPADmeter se calcula un valor numérico (unidades SPAD), el cual es proporcional a la cantidad de clorofila presente en la hoja (Figura 3).

**Figura 3.** Espectro de absorbancia de la clorofila extraída con acetona al 80% de una hoja (Manual del usuario SPADmeter 502, Minolta).

Con el objeto de expresar la unidades SPADmeter en  $\text{mg}$  de clorofila  $\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$ , se correlacionaron las unidades SPAD con los contenidos de clorofila obtenidos químicamente de 60 hojas maduras en diferentes estadios

de senescencia. A partir de que la segunda hoja presentó la lígula expuesta se tomaron un promedio de 8 hojas cada tercer día. Cada hoja se midió con el SPADmeter y se cuantificó químicamente sus contenidos de Chl *a*, Chl *b* y *x + c*, en extractos cetónicos (acetona al 80%) de acuerdo al método descrito en el punto 5.3.

#### **5.5 EXPERIMENTO 1: Determinación de la concentración óptima de BAP en el retraso de la senescencia foliar**

Para identificar la concentración óptima de la citocinina BAP, en el retraso de la senescencia foliar, se asperjaron tres concentraciones de BAP (0.1 mM, 0.01 mM y 0.001 mM) a plántulas de 21 días (DDS), las cuales mostraban la segunda hoja con lígula expuesta. Las aspersiones se hicieron cada tercer día por un periodo de 15 días. Cada cinco días se midieron los niveles relativos de clorofila de la segunda hoja madura de 20 plantas por tratamiento, con el medidor portátil de clorofila SPADmeter-502 (Minolta).

#### **5.6 EXPERIMENTO 2: Efecto de 0.1 mM de BAP en la senescencia foliar de trigo**

Determinada la concentración óptima de BAP (0.1mM) para retrasar la senescencia foliar, se estableció un segundo experimento. Se sembraron semillas de *T. aestivum* de la misma forma como se explicó en el experimento

uno (sección 5.5) bajo el mismo diseño experimental, realizándose algunos cambios que consistieron en asperjar la citocinina BAP cada tercer día (un total de 7 aspersiones) durante 20 días. Se cuantificaron los pigmentos clorofílicos, las proteínas solubles, la población de plastidios, los niveles de Rubisco, el potencial de agua, potencial osmótico, potencial de turgencia, tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> y conductancia estomática, de acuerdo con la metodología descrita a continuación.

### **5.6.1 Cuantificación química de pigmentos fotosintéticos**

Los pigmentos fotosintéticos se cuantificaron según la sección 5.4

### **5.6.2. Extracción y cuantificación de proteínas solubles totales.**

Un promedio de 150 mg de tejido fresco se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -40 °C. El tejido se maceró con 1ml 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 15000g a 4 °C durante 10 min. Se usaron 5µL del sobrenadante para la determinación de proteínas y 100 µL se usaron para determinar los niveles de la subunidad grande de Rubisco (LSU) (Makino *et al.*, 1986). Las proteínas solubles se cuantificaron por el método de Bradford (1976). Se hizo una curva patrón con BSA (albúmina de suero bovino, Sigma), se pesaron 12.5 mg de BSA y se disolvió en 50 mL de agua destilada; posteriormente, en tubos ependorff se colocaron 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 µL de la solución de BSA, los cuales se aforaron a 800 µL con agua destilada,

luego se agregaron 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford (Bio-Rad) para obtener un volumen de 1 mL y se agitaron con un vortex para homogenizar la mezcla.

La absorbancia de las diluciones se midieron a una longitud de onda de 595 nm en un lector de micro-placas (Multiskan Ascent, Labsystem), con la cual se obtuvo una curva de regresión, que posteriormente se utilizó para determinar el contenido de proteína en las muestras de trigo. Para la cuantificación de proteínas en las muestras, se tomaron 5  $\mu$ L del extracto los cuales se aforaron a 800  $\mu$ L con agua destilada, luego se agregó 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford para medir la absorbancia de cada muestra a 595 nm.

### **5.6.3 Niveles de Rubisco**

Los niveles de la subunidad grande (LSU) de Rubisco (55kDa) se determinaron de acuerdo al método no radiactivo de Makino *et al.* (1986). De la extracción de proteínas, se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L del sobrenadante, a la cual se le agregó 100  $\mu$ l de Tris HCl 50 mM a pH 6.8 (SDS 1%, 2-mercaptoetanol 2% y 12.5% de glicerol), la mezcla se hirvió a 100 °C por 5 minutos para desnaturalizar las proteínas y se centrifugó por 2 minutos a 11000 *g* y 4 °C.

Las proteínas se separaron mediante una electroforesis (SDS-PAGE) de acuerdo con Laemmli (1970). Las proteínas se separaron en un gel de apilamiento al 4% (6.1 mL de agua desionizada, 1.3 mL de bis acrilamida al 30%, 2.5 mL de Tris HCl 0.5M a pH 6.8, 0.1 de SDS al 10%, 50  $\mu$ L de APS al 10%, y 10  $\mu$ L de TEMED) y un gel separador al 12% (3.4 mL de agua desionizada, 4 mL Bis acrilamida al 30%, 2.5 mL Tris HCl 1.5M a pH 8.8, 0.1 mL de SDS al 10%, 50  $\mu$ L de APS al 10%, y 5  $\mu$ L de TEMED ). Cada carril del

gel se cargó con 10 µg de proteína, junto con un marcador de peso molecular de amplio rango (200, 116, 97, 66, 45, 31, 21, 14 y 6 KDa, Bio-Rad). El gel se montó en una cámara vertical de electroforesis (Mini-Poteman II Cell, Bio Rad) y se corrió a 20mA por 1.2 h usando una fuente de poder (Power Pac 3000, Bio Rad).

Las bandas se visualizaron con azul de Comassie (CBB-R 250 Sigma). El gel se fijó en una solución de ácido acético 7% y metanol 40% durante 30 min. Posteriormente, el gel se tiñó con azul de Comassie (ácido acético glacial 40 %, metanol 60% y azul de Comassie brillante 0.5%) durante 30 min, con agitación suave. Finalmente, el gel se destiñó con una solución de ácido acético 7.5% y metanol 10%, realizando 3 lavados de 30 minutos cada uno.

Las bandas de proteína de 55 kDa identificadas como la subunidad grande de Rubisco (LSU), fueron evaluadas en unidades de densidad óptica por mm<sup>2</sup> (UDO), con un programa de análisis (Quantity One 42.1, Bio Rad), con el objeto de comparar las intensidades relativas de las bandas entre tratamientos.

#### **5.6.4 Población de plastidios**

Fragmentos de 2 mm<sup>2</sup> de la parte media de la lámina se fijaron en una solución de 4% paraformaldehído, 2.5% glutaraldehído en amortiguador de fosfatos Sörensen, pH 7.2 (Ruzin, 1999). Luego de dos lavados en amortiguador de fosfatos, los fragmentos se deshidrataron en etanoles graduales (30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 96% y 100%, 100%) 30 min en cada cambio; posteriormente los fragmentos se infiltraron en una mezcla de etanol : resina Spurr 3:1 y 1:1 por 30 min. Los tejidos se incluyeron en resina Spurr

(Polyscience Inc.) grado mediano de pureza (5g de dióxido de vinilciclohexano, 3g de resina epóxica Dow 736 y 13g de nonenilsuccinico anhidro). Las muestras incluidas se vaciaron en moldes para resina (Pelco 10505) y se polimerizaron a 60 °C durante 24 h. Se hicieron cortes transversales de 1  $\mu$ m con una cuchilla de vidrio en un ultramicrotomo (Reichert OmU3), los cuales se tiñeron con una mezcla acuosa de azul de metileno (1% en borax 1%  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ): azure al 1% 1:1. Los cortes se observaron en un microscopio de luz compuesto a 40X. Se cuantificó el número de cloroplastos de 10 células del mesófilo en dos fragmentos de cuatro hojas por tratamiento, para hacer un total de 80 células por tratamiento.

#### **5.6.5 Relaciones hídricas ( $\Psi_A$ , $\Psi_s$ , $\Psi_t$ )**

##### **Potencial de agua total ( $\Psi_A$ )**

Las mediciones se hicieron con una bomba de presión (Scholander *et al.*, 1965; Pearcy *et al.*, 1991). La hoja se introdujo dentro de la cámara, dejando el peciolo expuesto, la presión en el interior de la cámara se incrementó hasta obtener un balance en la columna de agua del xilema en la hoja, el cual se alcanzó cuando una pequeña gota de savia apareció en la zona expuesta del peciolo (Turner, 1988), los resultados fueron expresados en MPa donde 1 Bar = 0.1 MPa.

##### **Potencial osmótico ( $\Psi_s$ )**

El potencial osmótico se determinó en un fragmento de la misma hoja que se usó para el  $\Psi_A$ , el fragmento de hoja se envolvió en papel aluminio, se introdujo en nitrógeno líquido y se maceró en un tubo ependorff para extraer el contenido celular. De la extracción se tomaron 10  $\mu\text{L}$  que se adicionaron a discos de papel filtro donde se midió el potencial osmótico con un osmómetro de presión de vapor (VAPRO/WESCOR 5520), los resultados fueron expresados en MPa. La ecuación utilizada fue la siguiente (Bidwell, 1993):

$$\Psi_s = CRT$$

Donde:

C = Concentración de la solución (expresada en moles de soluto por Kg de agua).

R = Constante de los gases  $0.00831 \text{ Kg MPa mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

K = Temperatura en grados Kelvin.

### **Potencial de turgencia ( $\Psi_t$ )**

El potencial de turgencia fue calculado mediante la ecuación general del potencial de agua:

$$\Psi_A = \Psi_s + \Psi_t$$

Por lo tanto la ecuación utilizada fue (Bidwell, 1993):

$$\Psi_t = \Psi_A - \Psi_s \text{ y expresada en MPa.}$$

### **5.6.6 Intercambio de gases ( $g_s$ , fijación de $\text{CO}_2$ )**

Se determinó la conductancia estomática y la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  con un analizador portátil de gases en el espectro infrarrojo (IRGA) modelo

(CIRAS-1, PPSYSTEMS). Las mediciones se hicieron en la segunda hoja con lígula expuesta, en 10 individuos por tratamiento cada cinco días por un periodo de 20 días. La tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> se expresó como  $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y la transpiración como  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

#### **5.6.7 Análisis estadístico**

Se realizaron correlaciones simples, análisis de varianza, comparación de medias (Tukey) y t-student con un nivel de confianza del 95%. El paquete estadístico utilizado fue STATGRAPHICS Plus 4.



## 6. RESULTADOS

### 6.1 Calibración del SPADmeter

Los valores SPAD medidos en los fragmentos de las hojas de trigo, variaron en un intervalo de 4.9 a 41.2; este intervalo de unidades SPAD permitió abarcar todas las tonalidades de verde durante la senescencia foliar. En cada fecha de muestreo seleccionado, el análisis estadístico mostró un valor promedio mínimo y un máximo (Cuadro 1).

La concentración de clorofila extractable mostró valores mayores conforme aumentaron las unidades SPAD; de tal forma que el valor más alto fue de  $4\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$  con un valor SPAD de 41.2 en las hojas verdes y el más bajo fue de  $0.40\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$  con un valor SPAD de 4.9 en hojas amarillas.

Se encontró una correlación significativa ( $\alpha = 0.01$ ,  $r = 0.90$ ) entre la concentración de clorofila ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$ ) y las unidades SPAD (Figura 4). La ecuación obtenida con la regresión, permite sustituir una lectura SPAD por su equivalente contenido de clorofila, sin destruir la hoja.

Cuadro 1. Unidades SPAD determinadas en la segunda hoja madura de trigo, con diferentes niveles de amarillamiento.

Días después de la siembra	Valor mínimo de unidades SPAD	Valor máximo de unidades SPAD	Promedio Unidades SPAD ±ES.
21	36.3	41.2	38.2 ±0.4
23	23.0	35.4	30.2 ± 2.2
25	22.6	29.4	25.8 ± 0.9
27	19.7	29.3	23.6 ± 1.3
29	11.1	26.6	20.1 ± 2.2
31	11.5	22.0	19.3 ± 1.8
33	6.4	18.1	14.5 ± 1.9
35	4.9	15.8	11.6 ± 1.2

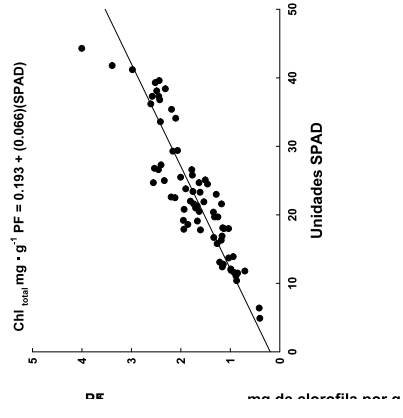
La ecuación que se propone para el cálculo de clorofila a partir de los valores SPAD es (Cuadro 2):

$$\text{Chl}_{\text{TOTAL}} = 0.192843 + (0.0667733)(\text{SPAD})$$

Cuadro 2. Valores correspondientes a la pendiente, ordenada y  $r^2$

Variable	Ordenada al origen $\beta_0$	Pendiente $\beta_1$	$r^2$
Clorofila	0.193	0.066	0.826

Otros autores han utilizado el SPADmeter para correlacionar el color verde de las hojas con la cantidad de nitrógeno en hojas de tomate (Rodríguez *et al.*, 1998) y hojas de maíz (Krugh *et al.*, 1994).



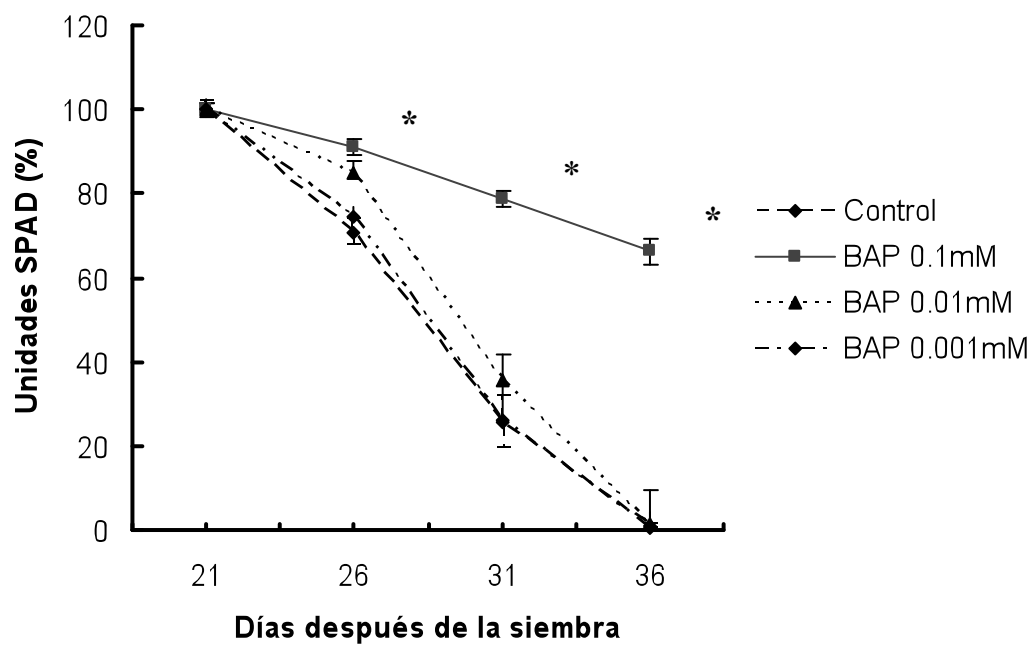
**Figura 4.** Modelo de regresión lineal entre clorofila relativa total y unidades SPAD en 60 hojas de trigo, ( $P < 0.01$ ).

## **6.2 Experimento 1: Determinación de la concentración óptima de BAP en el retraso de la senescencia foliar**

De las tres concentraciones probadas de BAP (0.1 mM, 0.01 mM y 0.001 mM), la solución con 0.1 mM fue la que mantuvo significativamente más altos ( $P < 0.05$ ) los niveles de clorofila medidos en unidades SPAD, en comparación con las soluciones 0.01 mM y 0.001 mM (Figura 5).

A los 31 DDS, el tratamiento con 0.1 mM de BAP retuvo el 78.6% de su contenido inicial de clorofila; mientras que las hojas asperjadas con las soluciones control, 0.01 mM y 0.001 mM presentaron el 25.5%, 35.3% y 26.2% de clorofila respectivamente, no encontrándose diferencias significativas entre los tres tratamientos ( $P > 0.05$ ).

Finalmente a los 36 DDS, la concentración de BAP 0.1 mM también fue la que retuvo el mayor porcentaje de clorofila (66.2%), mientras que las hojas tratadas con las soluciones control, 0.01 y 0.001 mM mostraron una disminución de un 100% en el contenido de clorofila (Figura 5).



**Figura 5.** Efecto de tres concentraciones de BAP en la retención relativa de clorofila (unidades SPAD), durante la senescencia (21-36 DDS). Los datos son promedio  $\pm$  E. S. (n=20).

\* Denota diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).

## **6.3 Experimento 2: Efecto de 0.1 mM de BAP en la senescencia foliar de trigo**

### **6.3.1 Pigmentos fotosintéticos totales**

Los niveles de pigmentos fotosintéticos en hojas asperjadas con BAP 0.1 mM fueron significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) que las hojas asperjadas con agua (control) durante la senescencia (Cuadro 3).

Los niveles de Chl total a los 26 DDS en hojas control mantuvieron un 77.5%, en contraste, las hojas tratadas con BAP conservaron el 91.1% de la Chl inicial. Los cambios significativos se observaron a los días 31, 36 y 41 DDS, en donde las hojas control conservaron el 67.0%, 42.5% y 12.0% respectivamente; mientras que las hojas tratadas con BAP conservaron el 73.0%, 73.0% y 57.4% de su Chl total inicial respectivamente.

La clorofila total y la cantidad de proteína soluble total (sección 6.3.2) de la segunda hoja se correlacionaron positivamente; con una  $r^2$  del 92% para plantas tratadas con BAP y control respectivamente.

En plantas control, la razón Chl *a* : Chl *b* se redujo de 3.7 a 1.1, mientras que las tratadas con BAP fue de 3.7 a 3.2 en 21 días, indicando una degradación preferencial de Chl *a* y pérdida de color verde resultado del envejecimiento en las hojas control (Cuadro 3). La razón Chl total : x+c se redujo en plantas control de 9.5 a 2.43, mientras que en plantas tratadas fue de 3.7 a 4.21 indicando un mayor grado de envejecimiento en las hojas control (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de 0.1 mM de BAP y solución control (CT) en la Chl total, Chl a y Chl b, x+c y razón de Chl total:x+ c de la segunda hoja de *T. aestivum* durante la senescencia (21-41 DDS).

DDS	Chl total (mg·g <sup>-1</sup> PF)			Chl a (mg·g <sup>-1</sup> PF)			Chl b (mg·g <sup>-1</sup> PF)			x+c (mg·g <sup>-1</sup> PF)			Razón Chl a:Chl b		Razón Chl total:x+c		
	CT	BAP	CT	BAP	CT	BAP	CT	BAP	CT	BAP	CT	BAP	CT	BAP	CT	BAP	
21	2.49±0.04	2.49±0.04	1.96±0.06	1.96±0.06	1.96±0.06	1.96±0.06	0.53±0.01	0.53±0.01	0.53±0.01	0.53±0.01	0.26±0.00	0.26±0.00	0.26±0.00	3.7	3.7	9.5	9.5
26	1.93±0.04	2.27±0.02	1.5±0.045	1.78±0.07*	1.5±0.045	1.78±0.07*	0.43±0.01	0.43±0.01	0.49±0.01*	0.49±0.01*	0.29±0.00	0.29±0.00	0.27±0.00	3.5	3.6	6.6	8.1
31	1.67±0.02	1.82±0.03*	1.29±0.05	1.71±0.04*	1.29±0.05	1.71±0.04*	0.38±0.01	0.38±0.01	0.48±0.01*	0.48±0.01*	0.28±0.01	0.28±0.01	0.32±0.03	3.4	3.6	5.9	6.8
36	1.06±0.06	1.82±0.00*	0.78±0.01	1.41±0.11*	0.78±0.01	1.41±0.11*	0.28±0.00	0.28±0.00	0.41±0.02*	0.41±0.02*	0.23±0.01	0.23±0.01	0.31±0.01*	2.8	3.4	4.6	5.9
41	0.30±0.01	1.43±0.01*	0.16±0.02	1.09±0.03*	0.16±0.02	1.09±0.03*	0.14±0.00	0.14±0.00	0.34±0.00*	0.34±0.00*	0.12±0.01	0.12±0.01	0.33±0.03*	1.1	3.2	2.4	5.2

Los datos son promedios ± E. S. (n=18).

\* Denota diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05).

El BAP contribuyó significativamente a la retención de clorofila *a* y *b* durante la senescencia de la segunda hoja. Las hojas tratadas con citocinina retuvieron el 90.8% de clorofila *a* y el 92.4% de clorofila *b* para el día 26 DDS. En contraste, las hojas control retuvieron el 76.5% de clorofila *a* y el 81.1% de clorofila *b* encontrándose diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

El día 31 y 36 DDS los niveles de retención de clorofila *a* en hojas asperjadas con citocinina fueron significativamente mas altos (87.2% y 71.9%) que las hojas control (65.8% y 39.7%) ( $P < 0.05$ ). Los niveles de retención de Chl *b* fue del 90.5% y 77.3% para el día 31 y 36 DDS, mientras que en hojas control hubo una disminución significativa del 71.6 % y 52.8% respectivamente. Finalmente a los 41 días DDS, los niveles de retención de Chl *a* fue de 57.4% ( $1.43 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{PF}$ ); mientras que las hojas control en el mismo tiempo solo retuvieron el 8.1% ( $0.16 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{PF}$ ). Con respecto a la Chl *b*, las hojas tratadas con BAP retuvieron el 64.1% ( $0.34 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{PF}$ ), mientras que en las hojas control solo se retuvo el 26.4% ( $0.14 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{PF}$ ) de este pigmento con respecto al valor inicial. Se observó que la Chl *b* se retuvo en mayor proporción (64.1%) que la Chl *a* (55.6%) al final del experimento (Cuadro 3).

Para el día 31 DDS las  $x + c$  en la hojas tratadas con BAP incrementaron en un 23%, sin embargo el incremento no fue significativo.

En el día 41 DDS, las  $x+c$  de las hojas tratadas con BAP se incrementaron un 26.6%; en contraste con las hojas control que disminuyeron significativamente sus niveles con respecto al valor inicial ( $P < 0.05$ ).

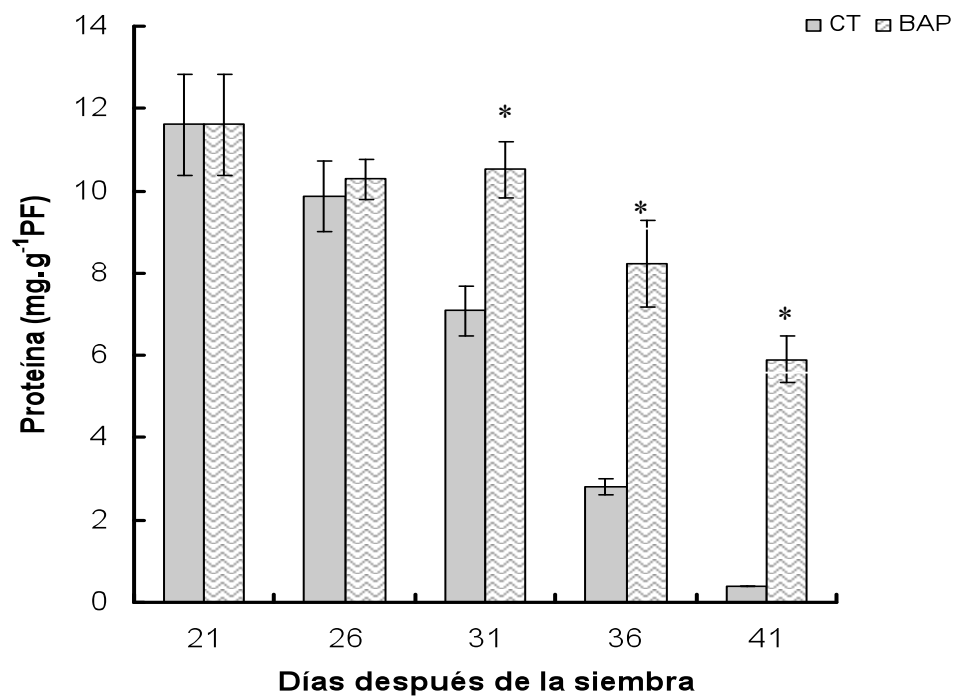


La razón Chl total : x+c en las hojas tratadas con la citocinina BAP, se mantuvieron con valores relativamente más altos (4.21) que las hojas control (2.43) a los 41 días DDS (Cuadro 3).

### **6.3.2 Proteína soluble total**

El contenido de proteína soluble disminuyó con el tiempo, tanto en el control como en el tratamiento con BAP, pero en forma más pronunciada en el control. Para el día 26 DDS se registró una ligera disminución en el contenido de proteína tanto en las hojas control (26%) como en el tratamiento con BAP (22%), sin encontrarse diferencias significativas entre tratamientos ( $P>0.05$ ).

Del día 26 DDS al día 31 DDS los niveles de proteína en las hojas tratadas con BAP no cambiaron; mientras que en hojas control la proteína se degradó en un 39%. Para el día 36 DDS, el 76% de la proteína se degradó en las hojas control; mientras que en las tratadas con BAP sólo fue del 29%. El efecto más significativo se observó a los 41 DDS, cuando las hojas tratadas con BAP conservaron un 50% de su proteína soluble total mientras que las hojas control retuvieron menos del 4% (Figura 6).



**Figura 6.** Concentración de proteína soluble total de la segunda hoja de *T. aestivum* por efecto de BAP (0.1 mM) y solución control (CT). Los datos son promedios  $\pm$  E.S. (n = 3)

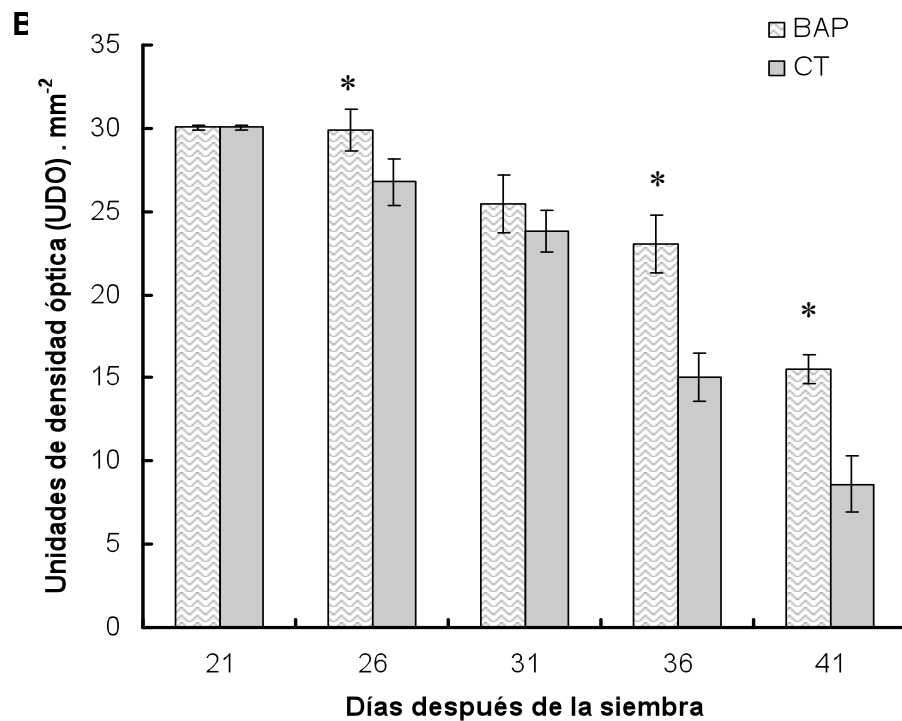
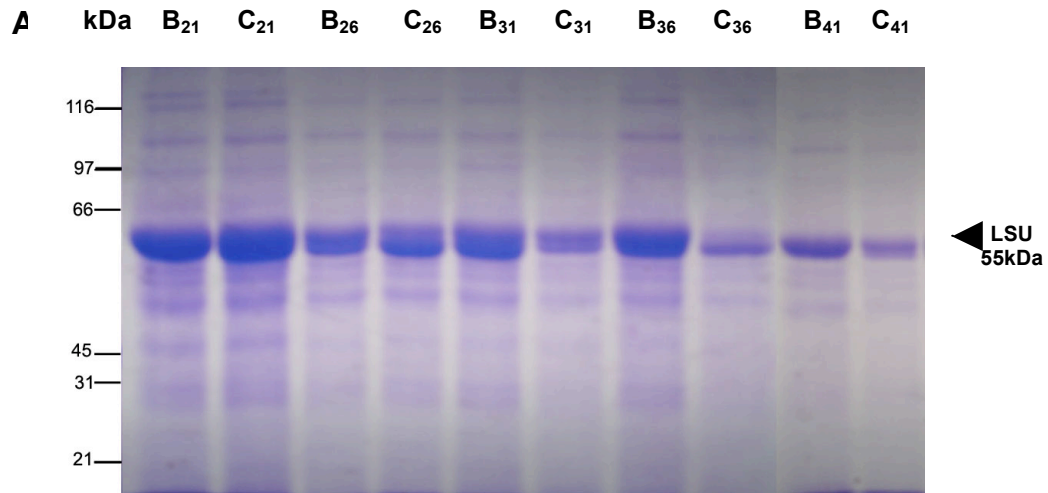
\* Denota diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05).

### **6.3.3 La subunidad grande (LSU) de Rubisco**

Con los extractos utilizados para la cuantificación de proteínas, se realizó la separación de proteínas totales (SDS-PAGE), en la cual se observó la subunidad grande de Rubisco (LSU) con un peso molecular de 55kDa. Las muestras tratadas con BAP presentaron las bandas de LSU más intensas que las muestras control (Figura 7A).

Posteriormente se hizo la densitometría de las bandas de LSU de Rubisco, para obtener valores cuantitativos los cuales fueron expresados en unidades de densidad óptica por  $\text{mm}^2$  ( $\text{UDO}\cdot\text{mm}^{-2}$ ) obteniendo los siguientes resultados:

La citocinina BAP retrasó de manera significativa la pérdida de la LSU en comparación con las hojas control. La concentración de LSU se mantuvo sin cambios significativos del día 21 al 31 (DDS) en las hojas con BAP conservando un 84.7% de los niveles iniciales, mientras que en las hojas control los niveles de LSU disminuyeron significativamente partir del día 26 DDS, perdiendo un 11% de la proteína ( $P<0.05$ ). El mayor efecto del BAP se observó en el día 41 DDS; las hojas asperjadas con la citocinina retuvieron el 51% de sus niveles iniciales de la LSU de Rubisco, mientras que las hojas control contenían el 28.3% con respecto al verde pre-senescente (Figura 7B).



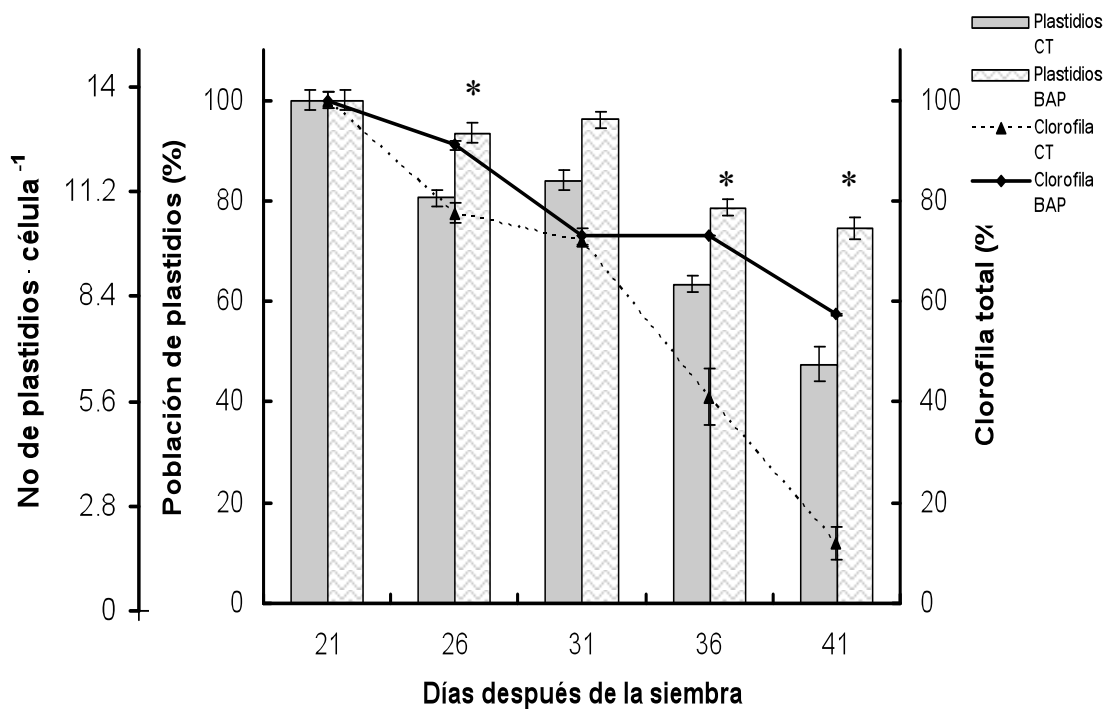
**Figura 7.** Contenido relativo de LSU de Rubisco expresada en unidades de densidad óptica · mm<sup>2</sup>. (A) SDS-PAGE de hojas de trigo tratadas con BAP (0.1 mM) y solución control (CT), los subíndices indican el día de muestreo. (B) Contenido relativo de LSU expresado en unidades de densidad óptica (UDO · mm<sup>-2</sup>) durante la senescencia foliar de la segunda hoja en *T aestivum*. Los datos son promedio ± E. S. (n = 3) de tres experimentos. \*Denota diferencias significativas entre tratamientos (P < 0.05).

#### **6.3.4 Población de plastidios**

Se encontró que la citocinina BAP mantuvo la población de plastidios (medida como el número de plastidios por célula en corte transversal) del mesófilo significativamente más alta (74.5%), que en hojas no tratadas (47.5%) de su población inicial ( $P < 0.05$ ).

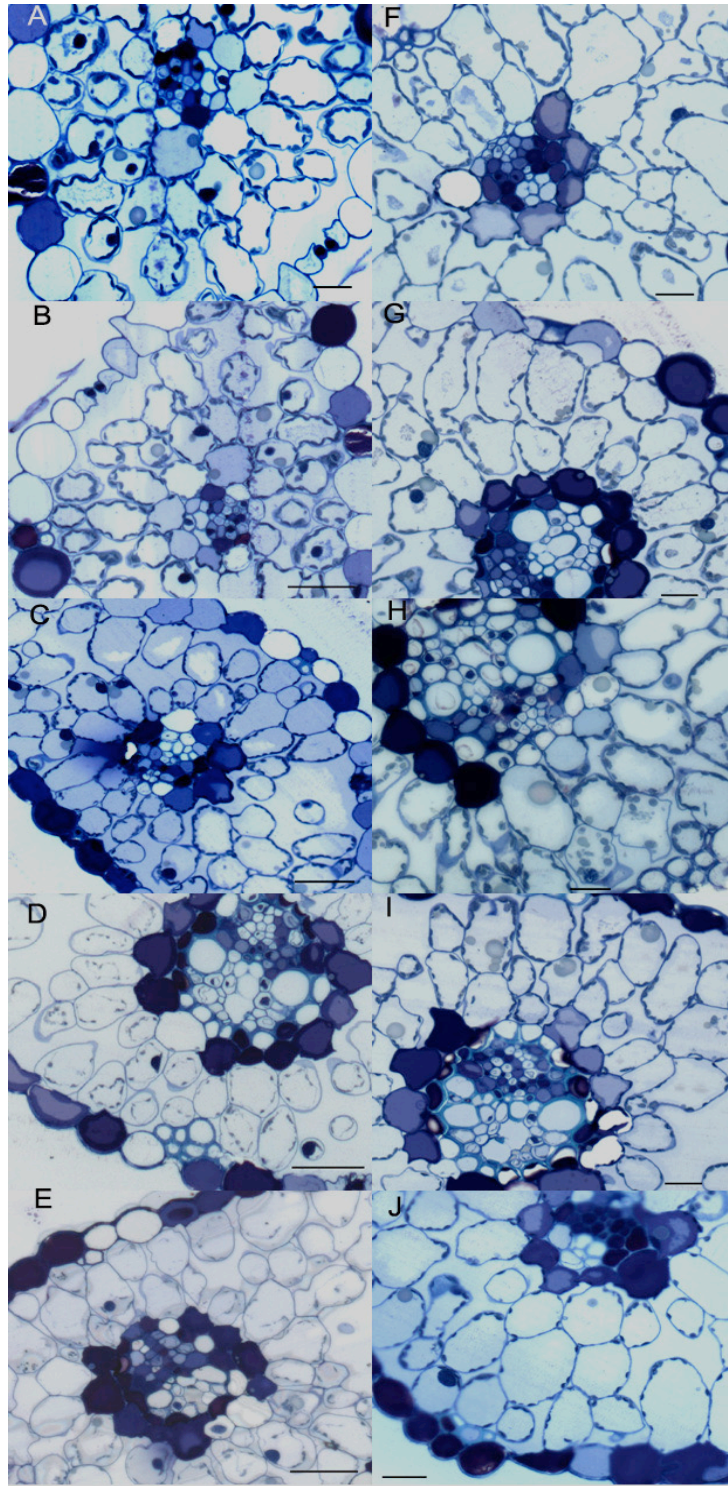
La población de plastidios se mantuvo sin cambios significativos del día 21 hasta el día 36 DDS en las hojas tratadas con BAP. Sin embargo, el número de plastidios por célula se redujo gradualmente en las hojas control para el día 31 DDS en un 84% con respecto al valor inicial (Figura 8 y 9). A partir de los 36 días DDS, el número de plastidios por célula en corte transversal se redujo en ambos tratamientos, pero el BAP mantuvo la población de plastidios significativamente más alta (80%) que el control (74.5%) en los días 36 y 41 DDS. En contraste las hojas control disminuyeron significativamente a un 64% y 47.5% respectivamente ( $P < 0.05$ ). Se encontró una baja correlación ( $r^2 = 35.5$   $P < 0.05$ ) entre la cantidad de Chl total y la población de plastidios de las hojas control, en contraste las hojas tratadas con BAP presentaron una alta correlación ( $r^2 = 83.8$   $P < 0.05$ ).

Algunas células del mesófilo de las hojas control a los 41 DDS no presentaron plastidios. El plasmalema de las células del mesófilo en este estadio de senescencia avanzada, se observó parcialmente colapsado con los cloroplastos senescentes (gerontoplasto) en posición interna, evidencia de la separación de la membrana plasmática de la pared celular. Mientras que en las hojas tratadas con BAP los cloroplastos se presentaron intactos y cercanos a la pared celular (Figura 9).



**Figura 8.** Población de plastidios medida como el número de plastidios por célula en corte transversal expresado en porcentaje (%) y Chl total, durante la senescencia de la segunda hoja madura de *T. aestivum*, por efecto de BAP (0.1 mM) y solución control (CT)  $\pm$  E. S. (n = 60).

\*Denota diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05).



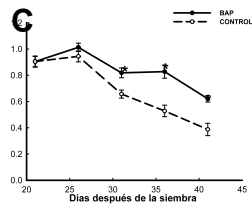
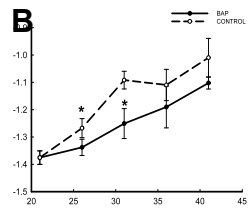
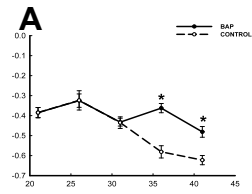
**Figura 9.** Corte transversal semifino (1 $\mu$ m) de hojas de trigo asperjadas con 0.1 mM de BAP (F – J) y solución control (A – E) durante la senescencia foliar. A y F verde 21 DDS, B y G 26 DDS, C y H 31 DDS, D y I 36 DDS y E y J 41 DDS. Barra = 20  $\mu$ m.

### 6.3.5 Relaciones hídricas ( $\Psi_A$ , $\Psi_s$ , $\Psi_t$ )

El  $\Psi_A$  de las plantas tratadas con BAP se mantuvo con niveles similares ( $P>0.05$ ) a los del verde pre-senescente (-0.48 MPa) durante el periodo de senescencia (21-41 DDS); en contraste, el control a los 41 DDS redujo su  $\Psi_A$  (-0.62 MPa) en un 61.8% con respecto a su estado inicial (Figura 10A).

Con respecto al  $\Psi_s$ , las plantas tratadas con BAP mantuvieron potenciales relativamente más bajos con respecto al control de los 21 a los 41 días DDS (Figura 10B). Las hojas control presentaron un incremento gradual durante este periodo, encontrándose diferencias significativas el día 26 DDS, en donde las hojas tratadas con BAP incrementaron su  $\Psi_s$  en un 7% (-1.33 MPa) en relación a su valor inicial; mientras que en las hojas control fue del 8.5% (-1.26 MPa). El día 31 DDS el  $\Psi_s$  en las hojas con BAP se mantuvo relativamente más bajo (-1.10 MPa) que en las hojas control (-1.19 MPa). Finalmente a los 41 días DDS, aunque no se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) el  $\Psi_s$  en las hojas tratadas con BAP se incrementó hasta -1.10 MPa mientras que en las hojas control fue del -1.0 MPa.





**Figura 10.** Relaciones hídricas en la senescencia de la segunda hoja madura de *T. aestivum* por efecto de BAP (0.1 mM) y solución control (CT).  $\Psi_A$  (A),  $\Psi_s$ (B) y  $\Psi_t$  (C).  $\pm$  E. S. (n = 8)

\* Denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).

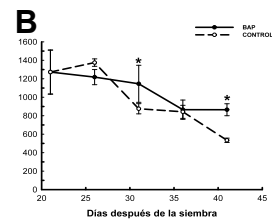
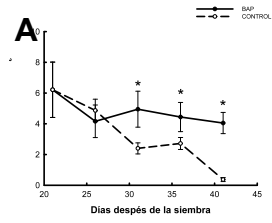
El potencial de turgencia ( $\Psi_t$ ) disminuyó gradualmente en ambos tratamientos, pero fue significativamente menor en las hojas control a partir de los 31 días DDS (Figura 10C). En el día 31 DDS, las plantas tratadas con BAP redujeron su  $\Psi_p$  a 0.81 MPa, mientras que en las hojas control fue de 0.65 MPa. En el día 36 DDS las hojas tratadas con BAP mantuvieron su  $\Psi_t$  (0.82 MPa) evidencia de un ajuste osmótico eficiente, en contraste, las hojas control redujeron su  $\Psi_t$  significativamente a 0.52 MPa. Finalmente en el día 41 DDS el  $\Psi_t$  se redujo a 0.38 MPa en las hojas control, mientras que las hojas con BAP la reducción fue significativamente menor (0.61 MPa) con respecto al valor inicial (hoja verde) (Figura 10C). El BAP mantuvo los  $\Psi_t$  significativamente más altos que las en las hojas control durante todo el periodo evaluado (21-41 DDS) en *T. aestivum*. (Figura 10C).

### **6.3.6 Intercambio de gases ( $g_s$ , fijación de $\text{CO}_2$ )**

La tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  permaneció constante en las hojas tratadas con BAP, mientras que en las hojas control, la asimilación de  $\text{CO}_2$  se redujo, encontrándose diferencias significativas a los 31, 36 y 41 días DDS entre tratamientos ( $P < 0.05$ ). Estos resultados indican que el BAP mantuvo funcionando la maquinaria fotosintética, con niveles cercanos ( $4 \mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) a los de las hojas verdes pre-senescentes ( $6.2 \mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) a los 41 DDS. Las plantas control redujeron su tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  en 61.3%, 56.2% y 94% los días 31, 36 y 41 DDS respectivamente; mientras que a los 41 DDS las hojas tratadas con BAP presentaron promedios

estadísticamente similares al estadio inicial ( $P > 0.05$ ), pero significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) a las hojas tratadas con solución control (Figura 11A).

Con respecto a la conductancia estomática, los resultados se comportaron similares a los obtenidos de la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$ . Estas dos variables están estrechamente relacionadas, entre mayor sea la conductancia mayor será la asimilación de  $\text{CO}_2$ . La conductancia estomática se mantuvo en 68% ( $864.9 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) en las hojas tratadas con BAP a los 41 DDS, mientras que en hojas control se redujo significativamente a 41% ( $534 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) con respecto al valor inicial ( $1272 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (Figura 11B).



**Figura 11.** Tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> (A) y conductancia estomática (B) en la senescencia de la segunda hoja madura de *T. aestivum* por efecto de BAP (0.1mM) y solución control (CT).  $\pm$  E. S. (n = 8)  
 \* Denotan diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).

## 7. DISCUSIÓN

Es ampliamente conocido que la aplicación externa de citocininas retarda los procesos de senescencia (Gan y Amasino, 1996, Vlčková *et al.*, 2006). Los resultados del presente trabajo, asumen que las citocininas participan activamente en el retraso de la senescencia y degradación de proteínas y clorofilas, conservan la población de plastidios, mantienen la actividad fotosintética y el intercambio de CO<sub>2</sub> en las hojas de trigo.

El efecto del BAP en el retraso de la senescencia foliar en *Triticum aestivum* var. Temporalera se estudió en plantas sembradas en macetas y en condiciones de invernadero; en donde las hojas senescieron de manera natural.

De las tres concentraciones de BAP probadas (0.1 mM, 0.01 mM y 0.001 mM) se observó que las hojas tratadas con BAP al 0.1mM en comparación con 0.01 y 0.001 mM presentaron el promedio más alto de unidades SPAD, reteniendo hasta el 66.6% de la clorofila para el día 36 DDS. La concentración más eficiente para retrasar la senescencia foliar en esta variedad fue la solución de 0.1 mM. Resultados similares fueron obtenidos por Li *et al.* (2000) al estudiar el efecto de BAP al 0.1mM en hojas de *Lolium multiflorum*, observando que la citocinina promovió una retención de hasta el 67.5% de los pigmentos iniciales.

Durante este experimento, se correlacionaron los niveles de pigmentos clorofilicos y las unidades de un SPADmeter para inferir las concentraciones de clorofila en mg·g<sup>-1</sup>PF, mediante un método no destructivo. Las determinaciones químicas de clorofila en tejidos vegetales (extractos de cetónicos al 80% o con N-dimetilformamida), son métodos utilizados para estimar el estado nutricional

del cultivo en lo que se refiere al nitrógeno, magnesio y hierro (Sachdchina y Dimitrieva, 1995).

Se ha reportado que la cantidad de clorofila y de nitrógeno total determinados por los métodos químicos tradicionales en leguminosas, gramíneas, frutales y hortalizas presentan una alta correlación con las unidades SPAD medidas con el detector de clorofila Minolta SPAD-501 (Reeves *et al.*, 1993; Rodríguez *et al.*, 1998).

Está demostrado que la “unidad SPAD” es un valor proporcional al contenido de clorofila y nitrógeno en varias especies. Esta correlación se demostró en maíz (Krugh *et al.*, 1994), trigo (Follet *et al.*, 1992; Fox *et al.*, 1994), pasto (*Festuca*) (Kantety *et al.*, 1996), algodón (Wood *et al.*, 1992) y arroz (Turner y Jund, 1991) con el fin de detectar posibles deficiencias de nitrógeno. En el presente trabajo se obtuvo una buena correlación ( $r^2 = 0.81$ ) entre las unidades SPAD y la concentración ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PF}$ ) de clorofila total (Cuadro 2). El SPADmeter es un instrumento útil para el seguimiento de la pérdida de clorofilas durante la senescencia de una misma hoja sin destruirla. El presente estudio confirma que las unidades SPAD son confiables para la medición de los niveles relativos de clorofila, evaluaciones que se utilizaron para monitorear los estadios de senescencia en trigo.

En el presente trabajo, se encontró que el BAP mantuvo los niveles de clorofila hasta en un 57% en contraste con las hojas control que sólo retuvieron un 12% en el día 41 DDS. La pérdida de clorofila podría explicar parcialmente la disminución de la actividad fotosintética, que fue observada en la última etapa de la senescencia. La reducción en la capacidad de transporte de electrones

podría contribuir a la disminución de la tasa fotosintética en hojas senescentes (Gay y Thomas, 1994). Se ha reportado una disminución paralela en los componentes del complejo cosechador de luz (LHCP), y transporte de electrones en hojas senescentes de *Lolium temulentum* bajo luz constante (Mae *et al.*, 1993).

En el presente estudio se encontró que el BAP retuvo la Chl *b* en mayor porcentaje (64%) que la Chl *a* (55%) en el día 41 DDS. Los pigmentos clorofilicos (Chl *a* y Chl *b*) en la hoja de *Lolium temulentum* se incrementan en los primeros 10 días, después de la emergencia y posteriormente declinan durante los proceso de senescencia; a excepción de las clorofilas *a* y *b*, los carotenoides permanecen constantes (Gay y Thomas, 1995); resultados similares encontramos en el presente estudio, en donde los carotenoides se incrementaron conforme avanzaba la senescencia; sin embargo para el día 41 DDS en hojas control, las x+c disminuyeron significativamente, así mismo la razón Chl *a* : Chl *b* disminuyó en mayor proporción en hojas control que en las tratadas con BAP. En la mayoría de las herbáceas la razón Chl *a* : Chl *b* disminuye durante la senescencia lo cual sugiere una degradación preferencial de la clorofila *a* o un cambio en los índices relativos de síntesis durante el remplazamiento de la clorofila existente (Gay y Thomas, 1995). En investigaciones previas, mostraron que la Chl *a* se degrada más rápido que la Chl *b*, se sugiere que la Chl *a* es convertida a Chl *b* previó a su degradación (Hörstensteiner *et al.*, 1995). La caída lenta en la proporción clorofila *a*:*b* observada en *T. aestivum* var. Temporalera podría reflejar una baja conversión

de clorofila *b* a clorofila *a*. El proceso de conversión se lleva a cabo en el tilacoide mediado por la clorofila *b* reductasa (Matile *et al.*, 1999).

Durante la senescencia foliar de *T. aestivum* var. Temporalera, la clorofila que se degradó en mayor proporción fue la *a* y posteriormente la *b*. Previos estudios revelan que la citocinina BAP retrasa la pérdida de clorofila *a* inhibiendo la actividad de clorofilasas durante la senescencia foliar en *Lolium temulentum* y trigo (Li *et al.*, 2000; Benbella y Paulsen, 1998).

El hecho de que la Chl *b* se conservara en mayor proporción que la clorofila *a*, probablemente se debió a una perturbación en la conversión de Chl *b* a Chl *a*. Esta conversión ocurre mediante una reducción de la feoforbide *b* a 7<sup>1</sup>-hidroxiclorofilide *a*, posteriormente se convierte en clorofilide *a* y eventualmente a clorofila *a*. Este evento se demostró mediante el marcaje del Zn de clorofilide *b* y de piroclorofilide *b* en hojas etioladas (Matile *et al.*, 1999). Durante la senescencia inducida con oscuridad en hojas de cebada, se observó un incremento en la actividad reductasa de la clorofilide *b*; esta enzima es muy importante, debido a que participa en la degradación de la clorofila *b*. Se sabe que muchas de las clorofilasas que aparecen durante la senescencia tienen más afinidad por pigmentos que contengan el grupo pirrolico “*a*” que el “*b*” (Matile *et al.*, 1999). La tendencia a una retención preferencial de clorofila *b* por citocininas requiere del estudio detallado de las enzimas antes mencionadas.

Las citocininas tienen la capacidad de retrasar y promover la síntesis de clorofilas en tejido joven de especies como *Hordeum vulgare* (Purohit y Chandra, 1980), *Zea mays* (Todorov *et al.*, 1992) y *Triticum aestivum* (Vičková *et al.*, 2006). En el caso de tejido senescente, el BAP principalmente retrasa la



pérdida de clorofila (Vlčková *et al.*, 2006). En algunas especies como *Nicotiana rustica*, bajo condiciones particulares, el BAP puede promover la síntesis de nuevas clorofilas en tejido senescente (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999a). Esto se debe a que las citocininas podrían estar modulando la expresión de genes que codifican para proteínas del complejo cosechador de luz (LHCP) y de enzimas como la POR (protoclorofilide oxido reductasa) que participa activamente en la ruta biosintética de la clorofila *a* y *b* (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999a). Sin embargo, en el caso de trigo no se observó un incremento en los niveles de clorofilas por lo que para poder determinar si hubo reemplazo de clorofilas por síntesis, se tienen que estudiar las enzimas de la ruta biosintética como la POR. Por lo tanto para conocer la acción del BAP en las enzimas importantes en las rutas biosintéticas, es necesario hacer un estudio detallado de la expresión génica de cada una de las enzimas participantes en la fotosíntesis.

En el presente estudio la concentración de x+c tuvo un incremento significativo del 26.6% en las hojas tratadas con BAP a los 41 DDS con respecto al valor inicial (21 DDS), en contraste, las hojas control presentaron una reducción en 65%. Esta respuesta puede estar relacionada con la participación conocida del BAP para incrementar la síntesis de carotenoides durante el proceso de senescencia foliar (Chernyad'ev, 2000). Esta síntesis de pigmentos accesorios (carotenoides), tiene como función proteger los centros de reacción de efectos dañinos de la luz y de compuestos reactivos de oxígeno; se conoce que la benciladenina y meta-topolin [mT; N6-(meta-hydroxibencil) adenina promueven la síntesis de carotenoides, compuestos de gran importancia, que protegen a las plantas de una sobre-excitación del aparato

fotosintéticos y daño foto-oxidativo (Demming-Adams, 1990; Young, 1991; Vičková *et al.*, 2006)

En éste estudio se encontró que la cantidad de proteína en la hoja se redujo significativamente en hojas control a los días 31, 36 y 41 DDS. La degradación de proteína es un evento importante durante el proceso de senescencia natural (Gan y Amasino, 1997). La degradación de proteínas puede ser explicado debido a que durante la senescencia el cambio estructural más evidente, es el envejecimiento y degradación del cloroplasto, el órgano que contiene cerca del 70% de la proteína de las hojas (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). Metabólicamente la asimilación de carbón (fotosíntesis) es remplazada por el catabolismo de clorofila y macromoléculas tales como proteínas, lípidos de membrana que de alguna manera se relacionan con el reciclaje de nutrientes (Gan y Amasino, 1997). Los cloroplastos contienen altos niveles de proteínas en el estroma como Rubisco y otras proteínas asociadas a las membranas tilacoidales (LHCP, Cyt<sub>f</sub> y otras). Hay evidencia de que la degradación se inicie dentro de los plastidios. Los cloroplastos contienen proteasas como la ClpP y ClpC que han sido identificadas en *Arabidopsis* y operan a lo largo de la senescencia. La degradación de proteínas no solo se da por la vía proteasas en los cloroplastos, también se puede llevar acabo por la vía ubiquitina y vacuolar (Buchanan-Wollastone *et al.*, 2003). La degradación por la vía de la ubiquitina consiste principalmente en degradar proteínas anormales con mal funcionamiento en el citosol; pero no se sabe bien si la ubiquitina también participa en la degradación de una gran cantidad de proteínas cloroplásticas. La ubiquitina degrada RNA y participa en la movilización de fósforo inorgánico (Pi)

en hojas senescentes (Buchanan-Wollastone *et al.*, 2003). Otro proceso de degradación de proteínas es la que se da por la vía vacuolar; pero este evento ocurre en la última etapa de la senescencia. Existe evidencia de que algunas proteasas se acumulan en la vacuola como agregados inactivos, los cuales maduran lentamente para ser liberados como enzimas proteolíticas durante estadios tardíos de senescencia foliar (Yamada *et al.*, 2001). Este proceso se lleva a cabo cuando la vacuola se degenera liberando proteasas que degradan las proteínas celulares (Hanaoka *et al.*, 2002). En la célula existen diferentes tipos de vacuolas con diferentes contenidos y composición en el tonoplasto (Jauh *et al.*, 1999). La presencia de por lo menos dos tipos de vacuolas en tabaco y soya, proveen diferentes compartimientos líticos para el desmantelamiento de los componentes celulares principalmente de proteínas y lípidos; sin embargo, aún se desconocen los mecanismos por los cuales se forman estas vacuolas (Otegui *et al.*, 2005).

La degradación de las proteínas tilacoidales como LHCP parecen seguir una ruta diferente, estas proteínas existen como complejos proteína-pigmento con las clorofilas y su estabilidad depende de la unión con el pigmento. La cantidad de clorofila se relaciona directamente con la cantidad de esta proteína, esto se demostró en un mutante de *Festuca*, cuyo catabolismo de la clorofila fue bloqueado, la proteína LHCP se estabilizó y no se degradó (Thomas y Donnison, 2000). El primer paso en la degradación de la proteína LHCP es la remoción de catabolitos clorofílicos los cuales desestabilizan los complejos proteicos permitiendo la degradación de ésta por proteasas cloroplásticas (Buchanan-Wollastone *et al.*, 2003).

La habilidad de las citocininas para evitar la degradación de proteínas solubles se ha demostrado bajo diferentes condiciones experimentales, tanto en plantas transformadas como en plantas asperjadas con citocininas (Spano *et al.*, 2003). En el presente estudio, los cambios en los contenidos de proteínas más importantes se observaron a partir de los 31 DDS, la citocinina BAP mantuvo altos los niveles de proteína soluble total, en contraste con su respectivo control; mientras que para el día 41 DDS las hojas tratadas con BAP retuvieron 50% de la proteína, en contraste con las hojas control que solo mantuvieron 4% de su proteína inicial. Este efecto podría deberse a que las citocininas regulan la expresión de algunas proteasas cloroplástica, en particular las degradadoras de Rubisco, la proteínas soluble más abundante (50%) del cloroplasto (Buchanan-Wollastone *et al.*, 2003). Se ha encontrado que células *in vitro* de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.cv William Sim) creciendo sin citocinina desarrollaron callos descoloridos, sin embargo con la adición de 5µM de benciladenina, los callos desarrollaron cloroplastos verdes (Genkov *et al.*, 1997). En estos se encontró una correlación entre la concentración de clorofila *a* y *b* y los niveles del complejo LHCP (Genkov *et al.*, 1997). Con base a lo anterior, se propone que el BAP reguló los niveles de clorofila y proteínas evitando la degradación del aparato fotosintético durante el retraso de la senescencia de trigo.

En la presente investigación, las hojas tratadas con BAP presentaron una retención de la subunidad grande de Rubisco (LSU); para el día 41 DDS del 51%; en contraste con las hojas control que solo retuvieron el 28.3%. Estudios en *Glycine max* (Jiang *et al.*, 1993) y *Oriza sativa* (Ookawa *et al.*, 2004)

sugieren que la disminución de los niveles de Rubisco durante la senescencia va acompañada de una disminución de los niveles de transcritos de ARNm (*rbcL* y *rbcS*). Sin embargo, otros estudios demuestran que las citocininas pueden promover la expresión de genes fotosintéticos y promover la síntesis de las proteínas respectivas como Rubisco y la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) en plantas C4 como el maíz (Suzuki *et al.*, 1994). Otro estudio demostró que al aplicar la citocinina benciladenina (BA) se producía una fuerte correlación entre los niveles de Rubisco y los niveles de transcritos de *rbcL* y *rbcS* (Ookawa *et al.*, 2004). Recientemente se demostró que la citocinina metatopolin [mT; N6-(meta-hidroxibenzil) adenina] tienen un efecto directo sobre la actividad enzimática de Rubisco (Vičková *et al.*, 2006). Hojas de trigo maduras fueron tratadas con m- Topolin e incubadas con luz continua y oscuridad para acelerar el proceso de senescencia, encontrando que en luz continua, la cantidad de almidón se incrementó en las hojas tratadas, debido a una alta actividad de la Rubisco y a una actividad de invertasas (Vičková *et al.*, 2006). Está demostrado que las citocininas retardan la degradación de Rubisco y de otras proteínas que participan en la fotosíntesis en *Nicotiana tabacum* (Wingler *et al.*, 1998). Las citocininas actúan a nivel molecular inhibiendo ciertos genes que codifican proteasas cloroplásticas y vacuolares, evitando la degradación de proteínas solubles y cloroplásticas. Sin embargo no se conoce a detalle los mecanismos de regulación génica.

La población de plastidios no presentó cambios significativos en las hojas tratadas con BAP. La población de plastidios para el día 36 y 41 DDS se redujo en 21.3% y 25.5% en las hojas tratadas con BAP; en contraste, las hojas control

perdieron 53.5% de su población inicial en el día 41 DDS. Las tendencias obtenidas en este experimento son similares a las observados por Camp *et al.* (1982); Peoples *et al.* (1980) y Kołodziejek *et al.* (2003), quienes propusieron que durante la última etapa de la senescencia existe una reducción en el número de cloroplastos en hoja de trigo, maíz y sorgo debido a su degradación. El patrón de pérdida de cloroplastos durante la senescencia foliar al parecer varía entre las especies; por ejemplo en arroz, se reporta una pérdida significativa en la población de plastidios desde el inicio de la senescencia (Kura-Hotta *et al.*, 1990). Se argumenta que la pérdida de clorofila en la hoja de arroz, esta determinada por la pérdida de cloroplastos (Hashimoto *et al.*, 1989). Contrariamente, los resultados de este trabajo, indican que durante la senescencia los niveles de clorofila disminuyeron primero y que los cloroplastos se degradaron después. En trigo, cuando la clorofila de la hojas control se había degradado en un 91.8% a los 41 días DDS, la población de plastidios disminuyó 52.5%; lo que indica que los cloroplastos primero pierden pigmentos y envejecen, sin perder su integridad estructural, de manera que las hojas senescentes de trigo poseen gerontoplastos amarillos. Nuestros datos coinciden con lo reportado en trigo y cebada por Martinoia *et al.* (1983) y Wardley *et al.* (1984). La teoría más aceptada sobre la degradación de cloroplastos propone una degradación autónoma *in situ* de los constituyentes cloroplásticos (Matile, 1992; Sakamoto, 2006). Existen varias evidencias que soportan esta hipótesis. Análisis estructurales de gerontoplastos sugieren el desensamblaje y degradación de las estructuras internas, proponiendo que éstas ocurren antes de que la doble membrana cloroplástica se degrade

(Martinoia *et al.*, 1983, Paramonova, 2002). Otro estudio demostró el efecto rejuvenecedor de la citocinina BAP en hojas senescentes de *Nicotiana rustica*, esta citocinina promovió el re-ensamblaje de cloroplastos envejecidos que habían perdido su organización interna, induciendo la formación de nuevas membranas (Zavaleta *et al.*, 1999b). También se sabe, que los cloroplastos tienen una concentración de citocininas que les permiten el correcto funcionamiento, cuya concentración disminuye conforme el cloroplasto envejece (Benková *et al.*, 1999).

Estos antecedentes sugieren que la adición de BAP a las hojas senescentes de trigo, ayudó a mantener altos los niveles de citocininas en los cloroplastos y mantuvo la integridad la maquinaria fotosintética del cloroplasto.

El  $\Psi_A$  regula muchas de las actividades fisiológicas y bioquímicas en las plantas (Wingler *et al.*, 2000). Es bien conocido que la disminución el contenido relativo de agua en hojas de plantas C3 y C4 genera  $\Psi_A$  bajos, reduciendo la tasa fotosintética así como la conductancia estomática (Lawlor, 2002). En el presente estudio se encontró que las citocininas mantuvieron altos los niveles del  $\Psi_A$  hasta en un 80% en contraste con las hojas control que solo mantuvieron el 21.2% del valor inicial. Se conoce que, durante la senescencia la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  disminuye, así como el transporte de electrones en la fotosíntesis (Gay y Thomas, 1995). Esto se debe principalmente al cierre de los estomas provocado por la acumulación de ABA que de manera natural se acumula en hojas senescentes (Kramer, 1983; Wingler *et al.*, 2000; Dodd, 2003). Los estomas son sensibles a la aplicación de citocininas dependiendo de la especie y edad de la hoja. En estudios previos, la citocinina BAP promovió la

apertura estomática favoreciendo que las hojas pudieran continuar con la actividad fotosintética (Incoll y Jewer, 1987; Stoll *et al*, 2000; Rulcová *et al*, 2001). El bajo  $\Psi_A$  encontrado durante la senescencia foliar de las hojas control de la variedad Temporalera, podría estar relacionada con la pérdida de proteínas, así como la disminución en la asimilación de  $\text{CO}_2$  y con la conductancia estomática como lo sugieren Tezara *et al.* (1999) y Parry *et al.* (2002). Contenidos relativos de agua bajos inhiben la actividad de Rubisco y disminuyen sus componentes, así como la síntesis de nuevas proteínas debido a que muchos polisomas no se forman o las proteínas sintetizadas no adquieren su estructura cuaternaria (Lawlor, 2002).

El  $\Psi_s$ , se incrementó significativamente en las hojas control del día 25 al 30 DDS, mientras que las hojas tratadas con BAP, en este mismo periodo, se mantuvieron con niveles más bajos que los controles. Los puntos más bajos del  $\Psi_A$  corresponden a los más altos en los del  $\Psi_s$  debido a que al existir menos agua disponible en el sistema por un efecto de la tasa de transpiración en la hoja (pérdida de agua en forma de vapor) los solutos se concentran aumentando el  $\Psi_s$  (O'Neill, 1983; Cadena, 2000). El BAP puede mejorar parcialmente el efecto negativo del déficit de agua, estimulando a las células a inducir un ajuste osmótico (Yadav *et al.*, 1997)

Con respecto al  $\Psi_t$ , las hojas tratadas con BAP mantuvieron altos potenciales; mientras que el  $\Psi_t$  de las plantas control fue significativamente menor que las tratadas con BAP a los 41 DDS; para esta fecha, las hojas control habían reducido su  $\Psi_t$  en un 68%. Cuando las plantas son sometidas a estrés hídrico se acelera la senescencia y el potencial hídrico disminuye hasta



en un 60% con respecto a las plantas bien hidratadas; sin embargo cuando esas mismas plantas son rehidratadas y tratadas con citocininas, el  $\Psi_A$  se incrementa de manera significativa con respecto a las plantas control, manteniendo la integridad y función de las células (Rulcová y Póspisilová, 2001). Poco se conoce de la regulación del  $\Psi_A$  mediante BAP, pero los resultados obtenidos en el presente trabajo y los de Rulcová y Póspisilová (2001), sugieren que el BAP es una citocinina que inhibe o retrasa la pérdida de agua o bien acelera la rehidratación. El BAP pudiera estar modificando la permeabilidad de las membranas para evitar la pérdida de agua.

En el presente trabajo se encontró que la citocinina BAP mantuvo la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  en un 71.4%, mientras que para las control fue del 6%. De igual forma ocurre con la conductancia estomática; las hojas tratadas mantuvieron el 68% del valor inicial, mientras que en las hojas control fue del 41%.

Se sabe que la senescencia foliar es una fase de desarrollo de la hoja, caracterizada por una disminución en la actividad fotosintética (Gay y Thomas, 1997; Wingler *et al.*, 2004). La senescencia tiene como finalidad la movilización de nitrógeno de la hoja envejecida hacia puntos en crecimiento. Este nitrógeno puede provenir de las proteínas fotosintéticas, tales como Rubisco, provocando una reducción en la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  (Wingler *et al.*, 2004). En este trabajo se determinó que la caída en la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$ , se relacionó con la pérdida de la LSU de Rubisco. Se encontró una alta correlación ( $r^2 = 81$ ,  $P < 0.05$ ) entre la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  y los niveles de LSU de Rubisco en las hojas control senescentes, mientras que, en hojas tratadas con BAP la

correlación fue menor ( $r^2 = 0.31$ ,  $P > 0.05$ ). El hecho de que existiera una mayor correlación entre la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  y los niveles de LSU durante la senescencia es debido a que ocurre una degradación lineal de proteínas solubles y estromales; en contraste con las plantas asperjadas con BAP que presentaron una menor correlación debido a que de alguna manera, el BAP retrasa la degradación de proteínas, modulando la actividad de enzimas proteasas y lipasas que mantienen la integridad de las membranas y mantienen la actividad bioquímica de las células. Se podría atribuir también, a que las citocininas son más eficientes para retrasar la pérdida de clorofilas que la LSU de Rubisco (Buchanan-Wollastone *et al.*, 2003).

La disminución de la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$ , también se asoció con la degradación de pigmentos clorofílicos y plastidios durante la senescencia en las plantas control; mientras que, en las plantas asperjadas con BAP, la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  se mantuvo relativamente más alta. Durante la senescencia en hojas de trigo, la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  disminuyó paulatinamente, debido a la traslocación de nitrógeno derivado de la degradación de proteínas cloroplásticas, hacia órganos en desarrollo. Otro factor importante fueron los bajos potenciales de agua en las plantas control, que podrían estar ocasionando una limitación de  $\text{H}^+$  y síntesis de ATP, disminuyendo el transporte de electrones. también se podrían estar promoviendo un incremento en los iones  $\text{Mg}^{2+}$  dentro del cloroplasto lo que provoca una limitación en la síntesis de Rubisco y su factor de acoplamiento (Rubisco-carboxilasa) inhibiendo la asimilación de  $\text{CO}_2$  (Lawlor, 2002). Sin embargo, las hojas asperjadas con BAP, mantuvieron la tasa de asimilación similar a las de las hojas verdes pre-

senescentes sin que hubiera cambios abruptos en las variables antes mencionadas.

Con respecto a la conductancia estomática, se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos a los 26, 31 y 41 DDS. Las plantas control redujeron significativamente la conductancia estomática, mientras que las tratadas con BAP mantuvieron la conductancia mas elevada que el control a los 41 DDS.

La disminución de la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> no se debe únicamente al aumento en la resistencia estomática, también podría estar asociada a un incremento en la foto-respiración; de hecho, se sugiere que los estomas participan activamente y son uno de los factores que controlan la senescencia (Friedrich y Huffaker, 1983). La conductancia estomática esta asociada a la enzima anhidro carboxilasa (CA), que facilita la transferencia del CO<sub>2</sub> dentro del cloroplasto (Tsusuki *et al.*, 1985). Es posible que el BAP este promoviendo un efecto protector en la degradación de la CA y esto promueva la conductancia estomática. Numerosas investigaciones demostraron que la CA está presente y activa en el mesófilo (Sasaki *et al.*, 1996). Algunos estudios han correlacionado el contenido de Rubisco con la actividad de la CA y la conductancia estomática, sugiriendo que la CA y Rubisco están mutuamente reguladas (Suzuki *et al.*, 1994). La conductancia estomática también se incrementa o disminuye de acuerdo a la temperatura de la hoja, si la temperatura aumenta la conductancia también se incrementa. La posible explicación es que las acuaporinas incrementan la permeabilidad al CO<sub>2</sub> de las membranas con la temperatura (Terashima y Ono, 2002). El hecho de que la conductancia estomática

permaneciera con niveles similares a los de las hojas pre-senescentes en Temporalera, se atribuye al efecto del BAP sobre los estomas. Los resultados de éste trabajo en trigo, concuerdan con los de *Avena sativa* Badenoch *et al.* (1996) y frijol encontrados por Rulcová y Póspisilová (2001); estos autores proponen que las citocininas promueven la apertura de los estomas con un incremento en la conductancia estomática. En plantas transformadas con el gen *itp* con altas concentraciones de citocininas, se observó un aumento en la tasa de transpiración y en la conductancia estomática (Wang *et al.*, 1997; Pospisilova *et al.*, 1998). El BAP es un antagonista del ABA, por lo que la adición de citocininas de manera exógena de 0.1 mM pueden modificar el efecto del ABA, promoviendo el retraso de la senescencia y el desmantelamiento del aparato fotosintético a los 41 DDS en trigo (Blackman y Davies 1983; Synková *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2006). La reducción de citocininas en la savia del xilema y el déficit hídrico en el suelo promueven la acumulación de ABA en las hojas y el inicio de la senescencia (Davies y Zhang, 1991). La adición a los medios de cultivo de BAP en plantas de *Digitalis granata* estimula la apertura estomática y la transpiración (Diettrich *et al.*, 1992). El mecanismo de acción de las citocininas sobre las células oclusivas podría involucrar un cambio eléctrico en membrana a través de una hiperpolarización electrogenica ( $H^+$ ), así como una estimulación en la actividad del adenilato ciclasa, guanilato ciclasa o interactuando directamente con el sistema calcio-calmodulina, regulando canales iónicos permeables a ABA (Incoll *et al.*, 1990; Morsucci *et al.*, 1991; Pharmawati *et al.*, 1998).

Este estudio demostró que el BAP mantiene las hojas turgentes con altos potenciales hídricos, favoreciendo la apertura estomática evidenciada por una conductancia estomática más alta que en las hojas control durante el retraso de la senescencia. Estos efectos se reflejan en el mantenimiento de la tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub> en niveles relativamente más altos que las hojas control; también se atribuye en este estudio el efecto protector de BAP durante la senescencia contra el daño foto-oxidativo como lo sugieren Vičková *et al* (2006), manteniendo la integridad del aparato fotosintético, evitando la degradación de Chl, incrementando los niveles de carotenoides y manteniendo de igual forma los niveles de proteínas asociadas con el intercambio de gases y fijación del CO<sub>2</sub> como la Rubisco.

## 8. CONCLUSIONES

El BAP mantiene la integridad del aparato fotosintético, evitando la degradación de Chl, incrementa los niveles de carotenoides; el BAP evita la pérdida de agua por evapo-transpiración, promueve altos  $\Psi_A$ ,  $\Psi_s$ ,  $\Psi_t$  y alta conductancia estomática. Estos efectos se vieron reflejados en la actividad fotosintética indicada por una tasa elevada de fijación de  $\text{CO}_2$ .

El BAP mantuvo los niveles de la LSU de Rubisco en un 51%, mientras que en las hojas control senescentes solo se retuvo en un 28.3% a los 41 días DDS.

La citocinina BAP promovió la apertura de los estomas, incrementando el intercambio de gases,  $g_s$  y la asimilación de  $\text{CO}_2$  hasta en un 50%, en contraste con las hojas no tratadas con este fitorregulador a los 41 días DDS.

En las hojas tratadas con BAP, los cloroplastos se mantuvieron en un 74.5% en contraste con las hojas control que solo mantuvieron el 47.5% de estos a los 41 días DDS.

La citocinina BAP mantuvo el potencial hídrico, osmótico y de turgencia con valores estadísticamente similares al verde (21 DDS), manteniendo el equilibrio hídrico y fotosintético.

De las tres concentraciones (0.1 mM, 0.01 mM y 0.001 mM) usadas de citocinina BAP para retrasar la senescencia en *T. aestivum*, la mas eficiente fue 0.1 mM.

La citocinina BAP retrasa la senescencia en *T. aestivum* var. Temporalera, retardando la degradación de componentes como pigmentos clorofílicos (clorofila *a*, *b* y xantofilas+carotenoides), proteínas y cloroplastos, que participan en la actividad fotosintética.

La clorofila *b* es el pigmento que mas se retiene (64%) durante el retraso de la senescencia por BAP en contraste con la clorofila *a* (55.6%). Las xantofilas y carotenoides se incrementaron significativamente (27%) en las hojas tratadas con BAP con respecto a las hojas control a los 41 días DDS.

## 9. LITERATURA CITADA

- Amasino R. 2005. 1955: kinetin arrives. The 50th anniversary of a new plant hormone. *Plant Physiology*. 138:1177–84.
- Badenoch-Jones J, Parker CW, Letham DS, Singh S. 1996. Effects of cytokinins supplied via the xylem at multiples of endogenous concentrations on transpiration and senescence in derroated seedlings of oat and wheat. *Plant Cell Environmental* 19: 504-516.
- Benbella M, Paulsen GM. 1998. Efficacy of treatments for delaying senescent of wheat leaves: I. Senescence under controlled conditions. *Agronomy Journal* 90:329-332.
- Benková E, Witters E, Van Dongen W, Kolá J, Motyka V, Brzobohatý V, Van Onckelen H, Machádková I. 1999. Cytokinins in tobacco and wheat chloroplasts occurrence and changes due to light/dark treatment. *Plant Physiology* 121: 245-252.
- Bidwell RGS. 1993. *Fisiología vegetal*. Trad. del inglés por: G. Cano y C. y M. Rojas G. AGT Editor, S.A. México. 784 pp.
- Biswal B, Biswal UC. 1999. Leaf senescence: Physiology and molecular biology. *Current Science Bangalore* 77: 775-782.
- Biswal UC, Biswal B. 1988. Ultrastructural modifications and biochemical change during senescence of chloroplast. *International Review of Cytology* 113: 271-321.
- Blackman PG, Davies WJ. 1983. The effects of cytokinins and ABA on stomatal behaviour of maize and *Commelina*. *Journal of Experimental Botany* 34: 1619 1626.



- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal of Biochemistry* 72: 248–254.
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink, D 2003. The molecular analysis of plant senescence - a genomics approach. *Journal of Plant Biotechnology* 1: 3-22.
- Cadena IJ. 2000. Intercambio de gases, relaciones hídricas y morfológicas en *Sechium edule* (Jacq.) Swartz por el cambio de hábitat. Tesis de Maestria. Colegio de Postgraduados. Méx. 87 pp.
- Camp PJ, Huber SC, Burke JJ, Moreland DE. 1982. Biochemical changes that occur during senescence of wheat leaves. I. Basis for the reduction of photosynthesis. *Plant Physiology* 70: 1641-1648.
- Chandlee JM. 2001. Current molecular understanding of the genetically programmed process of leaf senescence. *Physiologia Plantarum* 113:1-8.
- Chavez M. 2002. Water stress in the regulation of photosynthesis in the field. *Annals of Botany* 89: 907-916.
- Chernyad'ev II. 2000. Ontogenetic changes in the photosynthetic apparatus and effects of cytokinins. *Application Environment Microbiology* 36: 527–539.
- Crafts-Brandner SJ, Salvucci ME, Egli DB. 1990. Changes in ribulose biphosphate carboxilase/oxygenase and ribulose 5-phosphate kinase abundance and photosynthetic capacity during leaf senescence. *Photosynthesis Research* 23: 223-230.

- Davies WJ, Zhang J. 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 42:55–76.
- Demming-Adams B. 1990. Carotenoids and photoprotection: a role for xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1020: 1-24.
- Diettrich B, Mertinat H, Luckner M. 1992. Reduction of water loss during ex vitro acclimatization of micropropagated *Digitalis lanata* clone plants. *Biochemical Physiology Pflanz* 188: 23-31.
- Dodd CI. 2003. Hormonal interactions and stomatal responses. *Journal Plant Growth Regulator*. 22: 32-46.
- Fisher A, Feller U. 1994. Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 13, 241–273.
- Follet RH, Follet RF, Halverso AD. 1992. Use a chlorophyll meter to evaluate the nitrogen status of dryland winter wheat. *Communication in Soil Sciences and Plant Anal.* 23: 687-697.
- Fox RH, Piekielek P, MacNeal KM. 1994. Using chlorophyll meter to predict nitrogen fertilizer needs of winter wheat. *Communication in Soil Sciences and Plant Anal.* 25: 171-181.
- Friedrich WJ, Huffaker CR. 1983. Photosynthesis, leaf resistances and Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase degradation in senescing barley leaves. *Plant Physiology* 65: 1103-1107.
- Gan S, Amasino RM. 1996. Cytokinins in plant senescence: from spray and pray to clone and play. *Bioessays* 18: 557-565.

- Gan S, Amasino R. 1997. Making sense of senescence. Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology* 113: 313-319.
- Gan S, Amasino RM. 1995. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270:1986-1988.
- García E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. 4ta. Edición. 220 p.
- Gay AP, Thomas H. 1995. Leaf development in *Lolium temulentum*: photosynthesis in relation to growth and senescence. *New Phytologist* 130: 159-168
- Genkov T, Tsoneva P, Ivanova I. 1997. Effect of cytokinins on photosynthetic pigments and chlorophyllase activity in in vitro cultures of axillary buds of *Dianthus caryophyllus* L. *Journal Plant Growth Regulator* 16: 169–172.
- Ghosh S, Mahoney SR, Penterman JN, Peirson D, Dumbroff EB. 2001. Ultrastructural and biochemical changes in chloroplast during *Brassica napus* senescence. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 777-784.
- Grbic V, Bleeker AB. 1995. Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 8: 595-602.
- Grover A, Mohanty P. 1992. Leaf senescence-induced alterations in structure and function of higher plant chloroplasts. In: Abrol YP, Mohanty P, Govindjee, eds. *Photosynthesis: photoreactions to plant productivity*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 225-255.
- Guamét JJ, Tyystjärvi T, John I, Kairavuo M, Pychersky E, Noodén LD. 2002. Photoinhibition and loss of photosystem II reaction centre proteins during

- senescence of soybean leaves. Enhancement photoinhibition by the stay green mutation *cyt6*. *Physiologia Plantarum* 115: 468-478.
- Guiamét, JJ y Giannibelli, MC. 1994. Inhibition of the degradation of chloroplast membranes during senescence in nuclear 'stay green' mutants of soybean. *Physiologia Plantarum* 91: 395-402.
- Hanaoka H, Noda T, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, Tabata S, Ohsumi Y. 2002. Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an *Arabidopsis* autophagy gene. *Plant Physiology* 129: 1181–1193.
- Hashimoto H, Kura-Hotta M, Katoh S. 1989. Changes in protein content and in the structure and number of chloroplasts during senescence in rice seedlings. *Plant Cell Physiology* 30: 707-715.
- He Y, Gan S. 2002. A gene encoding an acyl hydrolase is involved in leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 805-815.
- Hinder B, Schellenberg M, Rodon S, Ginsburg S, Vogt E, Martinoia E, Matile P, Hörtensteiner S. 1996. How plants dispose of chlorophyll catabolites: directly energized uptake of tetrapyrrolic breakdown products in isolated vacuoles. *Journal Biologic Chemistry* 271: 27233-27236.
- Hörtensteiner S. 2006. Chlorophyll degradation during senescence. *Annual Review of Plant Biology* 57: 55-77.
- Höortensteiner S, Vicentini F, Matile P. 1995. Chlorophyll breakdown in senescent cotyledons of rape, *Brassica napus* L.: enzymatic cleavage of phaeophorbide a in vitro. *New Phytologist* 129: 237-46.

- Hörtensteiner SW, Uthrich KL, Matile P, Ongania K-H, Krautler B. 1998. The key step in chlorophyll breakdown in higher plants. Cleavage of *pheophorbide a* macrocycle by a monooxygenase. *Journal Biology and Chemistry* 273:1533-1539.
- Incoll ID, Jewer PC. 1987. Cytokinins and stomata. In Zeiger E, Farquhar GD, Cowan IR, editors. *Stomatal functions*. Stanford University Press, p 281-292.
- Incoll ID, Roy JP, Jewer PC. 1990. Do cytokinins act as root to shoot signals In: Davies WJ, Jeffcoat B, eds. *Importance of root to shoot communication in the responses to environmental stress*. Monograph No. 21, Long Aston, Bristol, UK: British Society for Plant Growth Regulation. 185-199 p.
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M. 2001. Identification of *CRE1* as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409:1060-63
- Ishida H, Makino A, Mae T. 1999. Fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species occurs near *Gly-329*. *Journal of Biological Chemistry* 274: 5222-5226.
- Ishida H, Anzawa D, Kokubun N, Makino A, Mae T. 2002. Direct evidence for non-enzymatic fragmentation of chloroplastic glutamine synthetase by a reactive oxygen species. *Plant Cell Environmental* 25: 625-631.
- Jauh GY, Philips TE, Rogers JC. 1999. Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell* 11: 1867-1882.
- Jiang C-Z, Rodermeil RS, Shible MR. 1993. Photosynthesis, Rubisco activity and amount, and their regulation by transcription in senescing soybean leaves. *Plant Physiology* 101: 105-112.

- Kakimoto T. 2003. Perception and signal transduction of cytokinins. *Annual Review of Plant Biology* 54:605-627
- Kantety RV, van Santen E, Woods FM, Wood CW. 1996. Chlorophyll meter predicts nitrogen status of tall fescue. *Plant Nutrition* 19: 881-889.
- Kołodziejek I, Koziół J, Wałęza M, Mostowska A. 2003. Ultrastructure of mesophyll cells and pigment content in senescing leaves of maize and barley. *Journal Plant Growth Regulator* 22: 217- 227.
- Kramer P. 1983. *Relaciones hídricas de suelos y plantas*. México. Industria Editorial Mexicana. 533 p.
- Kramer JP. 1989. *Relaciones hídricas de suelos y plantas*. Edit. Harla. México. 538 p.
- Krugh B, Bichham L, Miles D. 1994. The solid-state chlorophyll meter, a novel instrument for rapidly and accurately determining the chlorophyll concentrations in seedling leaves maize genetics cooperation. *News Letter* 68: 25-27.
- Kura-Hotta M, Hashimoto H, Satoh K, Katoh S. 1990. Quantitative determination of changes in the number and size of chloroplasts in naturally senescing leaves of rice seedlings. *Plant Cell Physiology* 31: 33-38.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lawlor WD. 2002. Limitations to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany* 89: 871-885.

- Li Q, Bettany AJE, Donnison I, Griffiths CM, Thomas H, Scott IM. 2000. Characterisation of a cysteine protease cDNA from *Lolium multiflorum* leaves and its expression during senescence and cytokinin treatment. *Biochimica et Biophysica Acta* 1492: 233-236.
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591-592.
- Lu C, Lu Q, Zhang J, Kuang T. 2001. Characterization of photosynthetic pigment composition, photosystem II photochemistry and thermal energy dissipation during leaf senescence of wheat plants grown in the field. *Journal of Experimental Botany* 49: 1805-1810.
- Ma Q-H, Lin Z-B, Fu D-Z. 2002. Increased seed cytokinin levels in transgenic tobacco influence embryo and seedling development. *Functional Plant Biology* 29:1107–1113.
- Mae T, Thomas H, Gay AP. 1993. Leave development in *Lolium temulentum* photosynthesis and photosynthetic proteins in leaves senescing under different irradiances. *Plant Cell Physiology* 34:391-399.
- Majeran W, Wollman FA, Vallon O. 2000. Evidence for a role of *ClpP* in the degradation of the chloroplast cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex. *Plant Cell* 12:137-150.
- Makino A, Tadahiko M, y Koji O. 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.

- Masferrer A, Arró M, Manzano D, Schaller H, Fernández-Busquets X, Moncaleán P, Fernández B, Cunillera N, Boronat A, Ferrer A. 2002. Overexpression of *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthases (FPS1S) in transgenic *Arabidopsis* induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *Plant Journal*. 30: 123-132.
- Martinoia E, Heck U, Dalling M J, y Matile P. 1983. Changes in chloroplast number and chloroplast constituents in senescent barley leaves. *Biochemical Physiology Pflanzenphysiol* 178: 147-155
- Matile P. 1992. Chloroplast senescence in: *Crop Photosynthesis: Spatial and temporal determinants*, Baker N. R. and Thomas H (Eds) Elsevier Science Publishers, London
- Matile P, Hörstensteiner S, Thomas H. 1999. Chlorophyll degradation. *Annual review Plant Physiology, Plant Molecular Biology* 50: 67-95.
- McCabe MS, Garratt LC, Schepers F, Jordi WJRM, Stoop GM, Davelaar E, van Rhijn JHA, Power B, Davey MR. 2001. Effects of *PSAG12-IPT* gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiology* 127:505-516.
- Miller CO, Skoog F, Von Saltza MH, Strong FM. 1955. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal American Chemical Society* 77:1392.
- Mok DWS, Mok MC. 1994. *Cytokinins: chemistry, activity and function*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Mok DWS, Mok MC. 2001. Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 89-118.



- Morsucci R, Curvetto N, Delmastro S. 1991. Involvement of cytokinins and adenosine 3'5'-cyclic-monophosphate in stomatal movement in *Vicia faba*. *Plant Physiology and Biochemistry* 29: 537-547.
- Murchie HE, Chen Y, Hubbart S, Peng S, Horton P. 1999. Interactions between senescence and leaf orientation determine in situ patterns of photosynthesis and photoinhibition in field-grown rice. *Plant Physiology* 119: 553-563.
- Nilsen ET, Orcutt DM. 1996. *The physiology of plants under stress*. John Wiley and Sons, New York.
- Noodén LD. 1988. Whole plant senescence. In: Noodén LD, Leopold ZC, eds. *Senescence and aging in plants*. San Diego, CA: Academic Press, Inc., 391-439 pp.
- Noodén LD, Guiamet JJ, Jonh I. 1997. Senescence mechanism. *Physiologia Plantarum* 101:746-753.
- O'Neill DS. 1983. Role of osmotic potential gradients during Water Stress and leaf senescence in *Fragaria virginiana*. *Plant Physiology* 72: 931-937.
- Ohya T, Suzuki H. 1988. Cytokinin-promoted polyribosome formation in excised cucumber cotyledons. *Journal of Plant Physiology* 133: 295-301.
- Ookawa T, Naruoka Y, Samaya A, Hirasawa T. 2004. Cytokinin effects on Ribulose-1,5-Biphosphate carboxylase/oxygenase and nitrogen partitioning in rice during ripening. *Crop Science* 44: 2107-2115.
- Ori N, Juarez MT, Jackson D, Yamaguchi J, Banowitz GM, Hake S. 1999. Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homobox

- gene *knotted1* under the control of a senescence-activated promoter. *Plant Cell* 11:1073–1080.
- Ortiz-Lopez A, Ort DR, Boyer JS. 1991. Photophosphorylation in attached leaves of *Helianthus annuus* at low water potentials. *Plant Physiology* 96: 1018-1025.
- Otegui SM, Noh Y, Dana E, Martínez ED, Martin G, Petroff V, Staehelin AL, Amasino MR, Guamet JJ. 2005. Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *The Plant Journal* 41: 831-844.
- Paramonova NV, Krasavina MS, Sokolova SV. 2002. Ultrastructure of chloroplasts in phloem companion cells and mesophyll cells as related to the stimulation of sink activity by cytokinins. *Russian Journal Plant Physiology* 49:187-195.
- Park JH, Oh SA, Kim YH, Woo HR, Nam HG. 1998. Differential expression of senescence-associated mRNAs during leaf senescence induced by different senescence-inducing factors in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 37, 445- 454.
- Parry MAJ, Andralojc PJ, Khan S, Lea PJ, Keys AJ. 2002. Rubisco activity: effects of drought stress. *Annals of Botany* 89: 833-839.
- Pearcy RW, Schulze ED, Zimmermann R. 1991. Measurement of transpiration and leaf conductance. In RW Pearcy, J Ehleringer, HA Mooney, PW Rundel. Time course of leaf senescence in water-deficient pea plants ds, *Plant Physiological Ecology*. Chapman and Hall, London, pp 137-160.

- Peoples BM, Beilharz CV, Waters PS, Simpson JR, Dalling JM. 1980. Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Chloroplast senescence and the degradation of Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase. *Planta* 149: 241-251.
- Pharmawati M, Billington T, Gehring CA. 1998. Stomatal guard cell responses to kinetin and natriuretic peptides are cGMP-dependent. *Cell Molecular Life Science* 54: 272-276.
- Pic E, De la Serve BT, Tardieu F, Turc O. 2002. Leaf senescence induced by mild water-deficit follows the same sequence of macroscopic, biochemical, and molecular events as monocarpic senescence in pea. *Plant Physiology* 128: 236-246.
- Picton S, Barton SL, Bouzayen M, Hamilton AJ, Grierson D. 1993. Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. *Plant Journal* 3: 469–481.
- Pospisilova J, Synkova H, Machackova I, Catsky J. 1998. Photosynthesis in different types of transgenic tobacco plants with elevated cytokinin content. *Biologia Plantarum* 40: 81-89.
- Purohit SS, Chandra K. 1980. Influence of dikegulak-sodium on chlorophyll degradation and chlorophyllase level in detached leaves of *Avena sativa*. *Current Science* 49:635–636
- Reeves WD, Mask PL, Wood CW, Delay DP. 1993. Determination of wheat nitrogen status with a handheld chlorophyll meter. Influence of management practices. *Journal of Plant Nutrition*. 16: 7781-7796.

- Roberts, JKM. 1987. NMR in plant biochemistry, *In* Davies DD. (Editor), The biochemistry of plants, Vol. 13, Academic Press, San Diego, CA, pp. 181-227.
- Rodríguez MN, Alcántar GG, Aguilar AS, Jorge D. Etchevers BJD, Santizo RJA. 1998. Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. *Terra* 16: 135-141.
- Roulin S. Feller U. 1998. Light-independent degradation of stromal proteins in intact chloroplasts isolated from *Pisum sativum* L. leaves: requirement for divalent cations. *Planta*, 205, 297-304.
- Rulcová J, Pospíšilová J, Vomáčka L. 2001. Effect of benzyladenine and hydroxybenzyladenosine on gas exchange of bean and sugar beet leaves. *Biologia Plantarum* 44: 523–528.
- Rulcová J, Pospíšilová J. 2001. Effect of benzylaminopurine on rehydration of bean plants after water stress. *Biología Plantarum* 44: 75-81.
- Ruzin SE. 1999. Plant microtechnique and microscopy. Oxford University Press, New York, New York, USA.
- Sachdchina TM, Dimitrieva VV. 1995. Leaf chlorophyll content as a possible diagnostic mean for the evaluation of plant nitrogen uptake from the soil. *Plant Nutrition* 18: 1427-1437.
- Sakakibara H. 2006. Cytokinins: Activity, Biosynthesis and translocation. *Annual Review of Plant Biology* 57: 431-449.
- Sakakibara H, Kasahara H, Ueda N, Kojima M, Takei K, 2005. *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the

- biosynthetic pathway in the host plant. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 102:9972-77.
- Sakamoto W. 2006. Protein degradation machineries in plastids. Annual Review of Plant Biology 57: 599-621.
- Sakano Y, Okada Y, Matsunaga A, Suwama T, Kaneko T. 2004. Molecular cloning, expression, and characterization of adenylate isopentenyltransferase from hop (*Humulus lupulus* L.). Phytochemistry 65: 2439-2446.
- Samuelson ME, Larsson C-M. 1993. Nitrate regulation of zeatin riboside levels in barley roots: effects of inhibitors of N assimilation and comparison with ammonium. Plant Science. 93:77-84.
- Sasaki H, Samejima M, Ishii R. 1996. Analysis by delta-13C measurement on mechanism of cultivar difference in leaf photosynthesis of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Physiology 37: 1161-1166.
- Schmülling T, Schäfer S, Romanov G. 1997. Cytokinins as regulators of gene expression. Physiologia Plantarum 100: 505-519.
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA. 1965. Sap pressure in vascular plants. Science 148: 339-346.
- Seemann RJ, Berry AJ, Freas MS, Krump AM. 1985. Regulation of ribulose biphosphate carboxylase activity in vivo by a light-modulated inhibitor of catalysis. Proceedings of the National Academy of Sciences 82: 8024-8028.
- Shanklin J, DeWitt ND, Flanagan JM. 1995. The stroma of higher plant plastids contain *ClpP* and *ClpC*, functional homologs of *Escherichia coli* *ClpP* and

- ClpA*: an archetypal two-component ATP-dependent protease. *Plant Cell* 7: 1713-1722.
- Shikanai T, Shimizu K, Ueda K, Nishimura Y, Kuroiwa T, Hashimoto T. 2001. The chloroplast *clpP* gene, encoding a proteolytic subunit of ATP-dependent protease, is indispensable for chloroplast development in tobacco. *Plant Cell Physiology* 42: 264-273.
- Slatyer RO, Taylor SA. 1960. Terminology in plant-soil water relations. *Nature* 187: 922-924.
- Smart MC. 1994. Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist* 126: 419-448.
- Spano G, Di Fonzo N, Perrotta C, Platani C, Ronga G, Lawlor DW, Napier JA, Shewry PR. 2003. Physiological characterization of 'stay green' mutants in durum wheat. *Journal of Experimental Botany* 54: 1415-1420.
- Stessman D, Miller A, Spalding M, Rodermel S. 2002. Regulation of photosynthesis during *Arabidopsis* leaf development in continuous light. *Photosynthesis Research* 72: 27-37.
- Stoll M, Loveys B, Dry P. 2000. Hormonal changes induced by partial rootzone drying of irrigated grapevine. *Journal of Experimental Botany* 51: 1627-1634.
- Strand M. 1997. The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum*. 101: 674-88.
- Suzuki I, Cretin C, Omata T, Sugiyama T. 1994. Transcriptional and posttranscriptional regulation of nitrogen-responding expresión of phosphoenolpyruvate carboxylase gene in maize. *Plant Physiology* 105:1223-1229.

- Synková H, Van Loven K, Pospíšilová J, Valcke R. 1999. Photosynthesis of transgenic *Pssu-ipt* tobacco. *Journal of Plant Physiology* 155: 173-182.
- Taiz L, Zeiger E. 1998. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Publishers. 2da edición. U.S.A. 792 p.
- Takei K, Sakakibara H, Taniguchi M, Sugiyama T. 2001. Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: Implication of cytokinin species that induces gene expressions of maize response regulator. *Plant Cell Physiology* 42: 85-93.
- Tanaka M, Takei K, Kojima M, Sakakibara H, Mori H. 2006. Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant Journal* 45: 1028-1036.
- Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, Nakajima N, Kondo N, Hasezawa S. 2006. Cytokinin and auxin inhibit abscisic acid-induced stomatal closure by enhancing ethylene production in *Arabidopsis* 57: 2259-2266.
- Terashima I, Ono K. 2002. Effects of HgCl<sub>2</sub> on CO<sub>2</sub> dependence of leaf photosynthesis: evidence indicating involvement of aquaporins in CO<sub>2</sub> diffusion across the plasma membrane. *Plant Cell Physiology* 43: 70-78.
- Tevini M, Steinmüller D. 1985. Composition and function of plastoglobuli II. Lipid composition of leaves and plastoglobulis during beech senescence *Planta* 163: 91-96.
- Tezara W, Mitchell VJ, Driscoll SD, Lawlor DW. 1999. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* 401: 914-917.

- Thomas H, Donnison I. 2000. Back from the brink: plant senescence and its reversibility. In: Bryant J, Hughes SG, Garland JM, eds. Programmed cell death in animals and plants. Oxford: Bios, 149-162.
- Thomas H, Stoddart JL. 1980. Leaf senescence. Annual Review of Plant Physiology 31: 83-111.
- Thompson DS, Davies WJ, Ho LC. 1998. Regulation of tomato fruit growth by epidermal cell wall enzymes. Plant Cell and Environment 21: 589–599.
- Thomson WW, Platt-Aloia KA. 1987. Ultrastructure and senescence in plants. In W Thomson, E Nothnagel, R Huffaker, eds, Plant Senescence: Its Biochemistry and Physiology. American Society of Plant Physiologists, pp. 20-30.
- Todorov D, Alexieva V, Karanov E, Velichkov D, Velikova V. 1992. Effect of certain dicarboxylic acid monoesters on growth, chlorophyll content, chlorophyllase and peroxidase activities, and gas-exchange of young maize plants. Journal of Plant Growth Regulator 11:233-238.
- Tommasini R, Vogt E, Fromenteau M, Hörtensteiner S, Matile P, Amrhein N, Martinoia E. 1998. An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. The Plant Journal 13, 773-780.
- Trevilla GC. 2004. Efecto de la citocinina BAP en la senescencia foliar de trigo (*Triticum aestivum* var. Temporalera): pigmentos y proteínas cloroplásticas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. 84p.



- Tsuzuki M, Miyachi S, Edwards GE. 1985. Localization of carbonic anhydrase in mesophyll cells of terrestrial 3-carbon pathway photosynthesis plants in relation to carbon dioxide assimilation. *Plant Cell Physiology* 26: 881-892.
- Turner NC. 1988. Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. *Irrigation Science* 9: 289-308.
- Turner NC. 1981. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant Soil* 58, 339-366.
- Turner FT, Jund FM. 1991. Chlorophyll meter to predict nitrogen topdress requirement for semiward rice. *Agronomy Journal* 83: 926-928.
- Veach YK, Martin RC, Mok DW, Malbeck J, Vankova R, Mok MC. 2003. O-Glucosylation of cis-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins. *Plant Physiology* 131: 1374-80.
- Venkatarayappa T, Fletcher RA, Thompson JE. 1984. Retardation and reversal of senescence in bean leaves by benzyladenine and decapitation. *Plant Cell Physiology* 25: 407-418.
- Vičková A, Špundová Ma, Kotabová E, Novotný R, Doležal K, Nauš J. 2006. Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light. *Physiologia Plantarum* 126: 257-267.
- Wang J, Letham DS, CornishE, Stevenson KR. 1997. Studies of cytokinin action and metabolism using tobacco plants ex-pressing either the ipt or the *GUS* gene controlled by chalcone synthase promoter. I. Developmental features of the transgenic plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 24: 661-672.

- Wardley TM, Bhalla PL, Dalling MJ, 1984. Changes in the number and composition of chloroplasts during senescence of mesophyll cells of attached and detached primary leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology* 75: 421-424
- Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC. 2000. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society London* 355: 1517-1529.
- Wingler A, Mares M, Pourtau N. 2004. Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence. *New Phytologist* 161: 781-789.
- Wingler A, von Schaewen A, Leegood RC, Lea PJ, Quick WP. 1998. Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars and light. Effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Planta* 116: 329-335.
- Wood CW, Tracy PW, Reeves DW, Edmisted KL. 1992. Determination of cotton nitrogen status with a hand-held chlorophyll meter. *Journal of Plant Nutrition* 15: 1435-1448.
- Woolhouse HW. 1984. The biochemistry and regulation of senescence in chloroplasts. *Canadian Journal of Botany*. 62: 2934-2942.
- Yamada K, Matsushima R, Nishimura M, Hara-Nishimura I. 2001. A slow maturation of a cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles of senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology*. 127: 1626-1634.
- Yadav N, Gupta V, Yadav VK. 1997. Role of benzyladenine and gibberellic acid in alleviating water-stress effect in gram (*Cicer arietinum*). *Indian Journal Agronomic Science* 67: 381-387.

- Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q, Liu L. 2002. Abscisic acid and cytokinins in the root exudates and leaves and their relationship to senescence and remobilization of carbon reserves in rice subjected to water stress during grain filling. *Planta* 215:645-652.
- Yoshida S. 2003. Molecular regulation of leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology* 6:79–84.
- Young AJ. 1991. The photoprotective role of carotenoids in higher-plants. *Physiologia Plantarum* 83: 702-708.
- Zavaleta-Mancera HA, Franklin KA, Ougham HJ, Thomas H, Scott IM. 1999a. Regreening of senescent *Nicotiana* leaves I. Reappearance of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase and light-harvesting chlorophyll a7b-binding protein. *Journal of Experimental Botany* 50: 1677-1682.
- Zavaleta-Mancera HA, Thomas BJ, Thomas H, Scott IM. 1999b. Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. II. Redifferentiation of plastids. *Journal of Experimental Botany* 50: 1683-1689.
- Zubko E, Adams CJ, Machaekova I, Malbeck J, Scollan C, Meyer P. 2002. Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. *The Plant Journal* 29: 797-808.