

LA CITOCININA BAP PROMUEVE LA ACUMULACIÓN DE HEXOSAS E INCREMENTA LA ACTIVIDAD DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA Y FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASA DURANTE EL RETRASO DE LA SENESCENCIA FOLIAR DE TRIGO

CYTOKININ BAP PROMOTES THE ACCUMULATION OF HEXOSES AND INCREASES THE ACTIVITY OF PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE AND PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE DURING THE DELAY OF LEAF SENESCENCE IN WHEAT

Rosalinda González-Santos¹, Adriana Delgado-Alvarado^{2*}, H. Araceli Zavaleta-Mancera¹, B. Edgar Herrera-Cabrera²

¹Botánica. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México.

²Campus Puebla. Colegio de Postgraduados. 72760. Carretera Federal México-Puebla, Santiago Momoxpan, Km 125.5. San Pedro Cholula, Puebla, México. (adah@colpos.mx)

RESUMEN

Las citocininas disminuyen su concentración durante la senescencia foliar pero la aspersión de la citocinina bencilaminopurina (BAP) retrasa este proceso, lo cual puede tener aplicaciones en el control de la senescencia de pastos forrajeros, ornamentales de follaje y hortalizas verdes. El objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto de la aplicación de BAP en el metabolismo primario durante la senescencia foliar de *Triticum aestivum* L. cv. Temporalera mediante el estudio del contenido de pigmentos fotosintéticos, proteínas solubles, Rubisco, carbohidratos, actividad enzimática de fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK), componentes importantes del metabolismo primario vegetal. Plántulas de 21 d después de la siembra (DDS) fueron asperjadas con BAP 0.1 mM o agua (testigo). A los 41 DDS las hojas tratadas con BAP retrasaron su senescencia, conservaron 60 % de su clorofila y 44 % de sus proteínas solubles totales en particular de la Rubisco. En contraste las hojas testigo perdieron 92 % de su clorofila y más del 90 % de proteínas, en el mismo periodo. La BAP promovió la acumulación de hexosas. El análisis de los resultados indica que la BAP puede aumentar la actividad de las enzimas PEPC y PEPCK durante la senescencia y se discute la función de estas enzimas para regular el pH y la translocación de compuestos nitrogenados durante el retraso de la senescencia foliar.

Palabras clave: *Triticum aestivum* L., Citocininas, hexosas, fosfoenolpiruvato carboxicinasa PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxilasa PEPC.

INTRODUCCIÓN

Durante la senescencia foliar, la asimilación de carbono se reemplaza por el catabolismo de clorofila y macromoléculas como proteínas,

ABSTRACT

Cytokinins reduce their concentration during leaf senescence; but spraying of the cytokinin bencilaminopurine (BAP) delays this process; this may have applications in the control of the senescence pasture, ornamental foliage and green vegetables. The objective of the present study was to investigate the effect of BAP application on primary metabolism during the leaf senescence of *Triticum aestivum* L. cv. Temporalera studying the photosynthetic pigments content, soluble proteins, Rubisco, carbohydrates, enzyme activity of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), major components of plant primary metabolism. Seedlings 21 d after sowing (DAS) were sprayed with 0.1 mM BAP or water (control). After 41 DAS the leaves treated with BAP delayed their senescence; they retained 60 % of chlorophyll and 44 % of their initial total soluble proteins, especially Rubisco. In contrast, control leaves, senesced, losing 92 % of chlorophyll and more than 90% of proteins in the same period. The BAP promoted the accumulation of hexoses. Results indicated that BAP can increase the activity of PEPC and PEPCK enzymes during senescence. It is discussed the function of these enzymes in the regulation of pH and the translocation of nitrogen compounds during the delay of leaf senescence.

Keywords: *Triticum aestivum* L., cytokinins, hexoses, phosphoenolpyruvate carboxykinase PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxylase PEPC.

INTRODUCTION

During leaf senescence, the assimilation of carbon is replaced by the catabolism of chlorophyll and macromolecules like proteins, membrane lipids and ARN; the material accumulated is turned into exportable nutrients for the developing organs (Lim *et al.*, 2007). Part of the energy required for the remobilization of the assimilates is obtained by

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Abril, 2008. Aprobado: Febrero, 2009.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 43: 379-391. 2009.

lípidos de membranas y ARN; el material acumulado se transforma en nutrientes exportables para los órganos en desarrollo (Lim *et al.*, 2007). Parte de la energía requerida para la removilización de los asimilados, se obtiene por el aumento de la respiración (Hopkins *et al.*, 2007). Se propone que los azúcares y algunos reguladores de crecimiento inducen la senescencia (Jordi *et al.*, 2000; Pourtau *et al.*, 2006). Durante la senescencia los azúcares tienen las siguientes funciones: intervienen en el control de la fotosíntesis (Wingler *et al.*, 1998), son elementos importantes en las relaciones fuente-demanda (Roitsch y Ehneá, 2000) e inducen y regulan enzimas involucradas en la movilización de nitrógeno (Masclaux *et al.*, 2000). Algunas de las enzimas del metabolismo de aminoácidos como la glutamina sintetasa citosólica y el glutamato deshidrogenasa, intervienen en la senescencia (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Esas dos enzimas participan en la conversión de aminoácidos en compuestos que puedan ser exportados de la hoja, como la glutamina, principal aminoácido transportable durante la senescencia natural (Feller y Fischer 1994). Otras enzimas como la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) se han estudiado poco durante la senescencia y mucho menos en plantas C3. La importancia de estas enzimas durante la senescencia es su intervención en el metabolismo de lípidos, de nitrógeno y en la regulación del pH (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2000; Gregersen y Holm, 2007). Se menciona que las enzimas PEPC y PEPCK mantienen el floema activo para facilitar la exportación de los compuestos nitrogenados generados durante la senescencia (Chen *et al.*, 2000). Además estas enzimas se encuentran en diferentes tejidos vegetales, especialmente en aquellos con un activo metabolismo de nitrógeno (Walker *et al.*, 2001; Delgado-Alvarado *et al.*, 2007).

Durante la senescencia disminuye la concentración de las citocininas, pero su aspersión o la sobre-expresión del gen *ipt*, que codifica la enzima isopenteniltransferasa (IPT) de *Agrobacterium tumefaciens*, bajo control del promotor específico de la senescencia SAG 12 (P_{SAG12} -IPT), retrasan los cambios catabólicos de la senescencia foliar (McCabe *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2007). A pesar del notable efecto que tienen las citocininas para retardar la senescencia en plantas, el mecanismo de acción aun no es bien entendido. Se propone que durante la senescencia, las citocininas son percibidas por receptores asociados a histidinas cinasas y que la señal generada se traduce por medio de una cascada de fosforilaciones que finalmente estimulan genes blanco responsables del programa del retardo de la senescencia foliar, donde intervienen principalmente tres módulos: los receptores histidina

a respiration increase (Hopkins *et al.*, 2007). It is proposed that sugars and some growth regulators induce senescence (Jordi *et al.*, 2000; Pourtau *et al.*, 2006). During senescence, sugars have the following functions: they take part in the control of photosynthesis (Wingler *et al.*, 1998), they are important elements in the source-sink relationships (Roitsch and Ehneá, 2000) and they induce and regulate the enzymes involved in the mobilization of nitrogen (Masclaux *et al.*, 2000). Some of the enzymes of the amino acid metabolism like cytosolic glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase take part in senescence (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). These two enzymes participate in the conversion of amino acids into compounds that can be taken from the leaf; like glutamine, the main amino acid that is transportable during natural senescence (Feller and Fischer, 1994). Other enzymes like the phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) have been poorly studied during senescence, and much less in C3 plants. The importance of these enzymes during senescence is their participation in the metabolism of lipids, of nitrogen and in the regulation of pH (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2000; Gregersen and Holm, 2007). Enzymes PEPC and PEPCK keep phloem active to facilitate the export of nitrogen compounds generated during senescence (Chen *et al.*, 2000). Also these enzymes are found in different plant tissues, especially in those with an active metabolism of nitrogen (Walker *et al.*, 2001; Delgado-Alvarado *et al.*, 2007).

During senescence the concentration of cytokinins diminishes, but their spraying or the over-expression of the *ipt* gene which encode the enzyme isopentenyltransferase (IPT), under the control of the specific promoter of senescence SAG 12 (P_{SAG12} -IPT), delay the catabolic changes of leaf senescence (McCabe *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2007). Despite the outstanding effect of cytokinins on delaying plant senescence, the mechanism of action is not well understood yet. The proposal is that during senescence cytokinins may be perceived by receptors associated with histidine kinases and the signal generated be translated through a cascade of phosphorylations that finally stimulate target genes that are responsible for the delay program of leaf senescence where three major modules are involved: the receptors histidine kinases (HK), phosphotransferase proteins (HP) and the response regulators (RR) (Lim *et al.*, 2007).

In this respect, in *Arabidopsis spp.* the histidine kinase 3 (AHK3), one of the three receptors of cytokinins, has a major function in the control of leaf longevity mediated by the specific phosphorylation of the ARR2, a response regulator (Kim *et al.*, 2006).

cinasas (HK), las proteínas fosfotransferasas (HP) y los reguladores de respuesta (RR) (Lim *et al.*, 2007). Al respecto, en *Arabidopsis spp.* uno de los tres receptores de las citocininas, la histidina cinasa 3 (AHK3), tiene una función primordial al controlar la longevidad de la hoja mediada por la fosforilación específica del regulador de respuesta ARR2 (Kim *et al.*, 2006).

El uso de las citocininas para retrasar la senescencia foliar tiene uso potencial para aumentar la productividad de cultivos, para prolongar el almacenamiento postcosecha y aumentar la tolerancia al estrés (Lim *et al.*, 2007). En cereales puede ser usado en la manipulación de la movilización de nutrientes para mejorar el rendimiento (Gregersen y Holm, 2007). Por tanto en el presente trabajo se estudia el efecto de la aplicación de la citocinina BAP en el metabolismo primario de trigo, durante el retraso de la senescencia foliar, con énfasis en la acumulación de azúcares y la actividad de PEPC y de PEPCK.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Un promedio de 50 semillas de trigo (*Triticum aestivum* L. cv. Temporalera) se sembraron en charolas de plástico (33×28×13cm), con una mezcla de peat-moss y agrolita estéril (3/1; v/v). Las charolas se distribuyeron en un diseño completamente aleatorio, con cuatro repeticiones para cada experimento. Los experimentos se realizaron en cámaras de crecimiento de ambiente controlado del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, con las siguientes condiciones: temperatura 23/19 °C (día/noche), fotoperíodo de 13.5 h e intensidad luminosa de 210 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La fertilización fue con una solución completa de Steiner (1984) con KNO_3 como fuente de nitrógeno.

Retraso de la senescencia

Plántulas de 20-21 d después de la siembra (DDS) que mostraron la segunda hoja madura (lámina completamente expandida y con lígula expuesta), se asperjaron (350 mL) con una solución de 0.1 mM de 6-bencilaminopurina (BAP; Sigma) con 0.02 % de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma) y 0.02 % de Tween 20 (Boehringer Mannheim GmbH) (Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2008). Las plántulas testigo se asperjaron con una solución preparada como la solución de BAP, pero sin el regulador de crecimiento. Las aspersiones se realizaron a las 11:00 h cada tercer día por 21 d. Se tomaron 3 cm de la parte media de la segunda hoja foliar, entre las 11:00 y 12:00 am. a los 21, 26, 31, 36 y 46 DDS y se determinaron las variables descritas a continuación.

Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

Para determinar clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), carotenoides y xantofilas (c+x), muestras de 150 mg de la parte

The use of cytokinins to delay senescence has potentially uses: to increase crop productivity, to prolong post-harvest storage, and to increase tolerance to stress (Lim *et al.*, 2007). In cereals cytokinins may be used in the manipulation of nutrient mobilization to improve yield (Gregersen and Holm, 2007). Therefore, the present study is focused on the effect of cytokinin BAP, on primary metabolism, during the delay of leaf senescence of wheat, with an emphasis on the accumulation of sugars and the activity of PEPC and PEPCK.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

An average of 50 wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Temporalera) seeds were sown in plastic trays (33×28×13cm), with a mixture of peat-moss/sterile agrolite (3/1; v/v). Trays were placed following a completely randomized design, with four repetitions for each experiment. The experiments were conducted in growth chambers of a controlled environment at the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo: temperature 23/19 °C (day/night), photoperiod of 13.5 h with a light intensity of 210 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Fertilization was made with a full Steiner solution (1984) with KNO_3 as a nitrogen source.

Senescence delay

Seedlings of 20-21 d after sowing (DAS) showing the second mature leaf (fully extended blade with exposed ligulae) were sprayed (350 mL) with a 0.1 mM solution of 6-bencilaminopurine (BAP; Sigma), 0.02 % of dimethylsulphoxide (DMSO; Sigma) and 0.02 % of Tween 20 (Boehringer Mannheim GmbH) (Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2008). Control seedlings were sprayed with a prepared solution like that of BAP, but without the growth regulator. Spraying was carried out at 11:00 h every other d for 21 d. Three centimeters of the middle part of the second leaf were taken between 11:00 and 12:00 am. at 21, 26, 31, 36 and 46 DAS and the variables described below were determined.

Quantification of photosynthetic pigments

To determine chlorophyll *a* (Chl *a*), chlorophyll *b* (Chl *b*), and carotenoids and xanthophylls (c+x), 150 mg of tissue from the middle part of the leaf were ground in 3 mL of 80 % acetone at 4 °C; the extract was centrifuged for 10 minutes at 840 g. The supernatant was recovered and adjusted at 4 mL with 80% acetone. Determinations were performed according with Lichtenthaler and Wellburn (1983) and expressed in mg g^{-1} fresh weight (FW).

Soluble proteins and content of the LSU of Rubisco (EC 4. 1. 1. 39)

Samples of 250 mg of the middle part of the leaf were ground in 1 mL of 50 mM pH 7.5 sodium phosphate buffer containing 1 mM

media de la hoja se maceraron en 3 mL de acetona 80 % a 4 °C; el extracto se centrifugó 10 min a 840 g. El sobrenadante fue recuperado y ajustado a 4 mL con acetona 80 %. La concentración de cada pigmento se cuantificó con la fórmula de Lichtenthaler y Wellburn (1983) y se expresó en mg g⁻¹ peso fresco (PF).

Proteínas solubles y contenido de la subunidad grande de Rubisco (EC 4. 1. 1. 39)

Muestras de 250 mg de la parte media de la hoja se maceraron con 1 mL de amortiguador de fosfato de sodio 50 mM pH 7.5 que incluyó 1 mM de DTT, 0.1 mM de EDTA y 12.5 % de glicerol. El extracto se centrifugó 10 min a 15000 g a 4 °C y el sobrenadante se usó para determinar proteínas solubles totales y para medir el contenido de la subunidad grande de Rubisco (LSU). El contenido de proteína total se determinó en 5 mL de los extractos por el método de Bradford (1976), usando albúmina de suero bovino como estándar. El extracto de proteína se separó mediante un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), de acuerdo con Makino *et al.* (1986). También se corrió un extracto puro de Rubisco de espinaca (R8000, Sigma) y un marcador de peso molecular conocido de rango bajo (Bio-Rad). Las bandas de proteína de 55 kDa identificadas como LSU se evaluaron en unidades de densidad óptica (ODU mm⁻²), con el programa de análisis Quantity One 42 (Bio Rad), para comparar las intensidades relativas de las bandas entre tratamientos.

Cuantificación de azúcares solubles y almidón

Los azúcares se extrajeron con 4-6 incubaciones sucesivas de 10-min en etanol (80%, v/v, 70 °C) y se determinaron enzimáticamente como describe Scholes *et al.* (1994). Los extractos se evaporaron a 50 °C y se disolvieron en agua destilada. Glucosa, fructosa y sacarosa se evaluaron después de la adición secuencial de hexocinasa, fosfoglucosa-isomerasa e invertasa. El tejido remanente se homogenizó en 1 mL de agua destilada, permaneció 30 min en autoclave y el contenido de almidón se determinó en esta mezcla incubando una alícuota de 100 µL con una solución de enzimas hidrolíticas (100 µL de MES-KOH 500 mM, pH 4.5, 50 µL de amiloglucosidasa 4 mg mL⁻¹, y 50 µL de α-amilasa 90 mg mL⁻¹) por 4.5 h a 37 °C y finalmente se determinó como glucosa (Scholes *et al.*, 1994).

Actividad de fosfoenolpiruvato carboxinasa (PEPCK-ATP: EC 4. 1. 1. 49)

Muestras de 200 mg de hojas frescas se homogeneizaron en 0.5 mL de bicina-KOH 200 mM (pH 9.0) que contenía 50 mM de DTT a 4 °C. La actividad se midió de acuerdo a Delgado-Alvarado *et al.* (2007). La mezcla de reacción incluyó: 100 mM de Hepes-KOH (pH 6.8), 100 mM de KCl (Merck), 0.1 mM de NADH (Sigma), 6 mM de MnCl₂ (Merck), 6 mM de PEP (Sigma), 1 mM de ADP (Sigma), 90 mM de KHCO₃ (Sigma), 6 U mL⁻¹ de MDH (Sigma) y 30 µL de extracto enzimático. Una unidad de actividad de PEPCK corresponde a la producción de 1 µmol min⁻¹ de oxalacetato a 25 °C.

DTT, 0.1 mM EDTA and 12.5 % glycerol. The extract was centrifuged for 10 min at 15000 g at 4 °C, and the supernatant was used to quantify total soluble proteins the Bradford method (Bradford, 1976), using as a standard bovine serum albumin (BSA). Proteins were separated by electrophoresis using a polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE), according to Makino *et al.* (1986). A spinach Rubisco pure extract (R8000, Sigma) was run as a reference, and a low molecular weight marker (Bio-Rad). The bands of 55 kDa protein identified as LSU were evaluated in optical density units (ODU mm⁻²), with the analysis program Quantity One 42 (Bio-Rad), to compare the relative intensity levels of the bands among treatments.

Quantification of soluble sugars and starch

Sugars were extracted with 4-6 successive incubations of 10-min in ethanol (80 %, v/v, 70 °C) and they were quantified by an enzymatic assay, as described by Scholes *et al.* (1994). The extracts were evaporated at 50 °C and dissolved in distilled water. Glucose, fructose and sucrose were assayed after the sequential addition of hexokinase, phosphoglucose-isomerase and invertase. The remaining tissue was homogenized in 1 mL of distilled water; it was autoclaved for 30 min. and the starch content was measured in this mixture by incubating 100 µL aliquots of a buffered solution of hydrolytic enzymes (100 µL of 500 mM MES-KOH, pH 4.5, 50 µL 4 mg mL⁻¹ amyloglucosidase, and 50 µL of 90 mg mL⁻¹ α-amylase) for 4.5 h at 37 °C and finally it was measured as glucose (Scholes *et al.*, 1994).

Phosphoenolpyruvate carboxykinase activity (PEPCK-ATP: EC 4. 1. 1. 49)

Samples of 200 mg of fresh leaves were homogenized in 0.5 mL of 200 mM bicine-KOH (pH 9.0) containing 50 mM DTT at 4 °C. The activity was assayed as described by Delgado-Alvarado *et al.* (2007). The assay mixture included: 100 mM Hepes-KOH (pH 6.8), 100 mM KCl (Merck), 0.1 mM NADH (Sigma), 6 mM MnCl₂ (Merck), 6 mM PEP (Sigma), 1 mM ADP (Sigma), 90 mM KHCO₃ (Sigma), 6 U mL⁻¹ MDH (Sigma) and 30 µL enzyme extract. One unit of PEPCK activity corresponds to the production of 1 µmol min⁻¹ of oxalacetate at 25 °C.

Phosphoenolpyruvate carboxylase activity (PEPC: EC 4. 1. 1. 31)

The analysis of PEPC activity was tested with the method proposed by Aguilar-Becerril and Peña-Valdivia (2006). The composition of the assay solution (components/solution/formula) and the order of its addition was : 975 µL of buffer solution (100 mM Tris-HCl, pH 8.0), 20 mM MgCl₂ (Merck), 5 mM NaHCO₃ (Baker), 5 U mL⁻¹ MDH (Sigma), 0.5 mM NADH (Sigma), 3 mM PEP (Sigma) and 30 µL of crude extract. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that transform 1 µmol min⁻¹ of phosphoenolpyruvate.

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

El análisis de la actividad de PEPC se realizó con el método propuesto por Aguilar-Becerril y Peña-Valdivia (2006). La composición del medio de reacción y el orden en que se agregaron fue: 975 μL de la solución amortiguadora (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0), 20 mM de MgCl_2 (Merck), 5 mM de NaHCO_3 (Baker), 5 U mL^{-1} de MDH (Sigma), 0.5 mM de NADH (Sigma), 3 mM de PEP (Sigma) y 30 μL de extracto crudo. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima capaz de transformar 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ de fosfoenolpiruvato.

Liberación de electrolitos

La integridad relativa de la membrana plasmática se determinó indirectamente mediante la liberación de electrolitos con una adaptación de los métodos descritos por Prášil y Zámeňnýk (1998) y Sánchez-Urdaneta *et al.* (2004). Se midió la conductividad eléctrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$) con un conductímetro (Horiba b-173, Kyoto, Japón). Los resultados se expresaron en valores relativos (%).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza con los datos y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) usando el paquete estadístico STATGRAPHICS Plus 4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La degradación de proteínas fue significativa a los 26 DDS, por el contrario, el tratamiento con BAP retrasó la degradación de proteínas solubles (Figura 1 A y B). Resultados similares fueron obtenidos con plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) transformadas con el gen *ipt* que codifica la enzima isopenteniltransferasa (IPT), bajo control del promotor de un gen específico de la senescencia, SAG 12 (Jordi *et al.*, 2000). Además, BAP indujo la acumulación de glucosa y fructosa a los 31 y 36 DDS (Figura 3 A y B). La acumulación de estos carbohidratos podría explicarse por la influencia de citocininas en el mantenimiento de la fijación de CO_2 durante la senescencia de hojas de trigo (Wingler *et al.*, 1998; Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2008).

Pigmentos fotosintéticos

Una de las evidencias más notables del efecto benéfico de la aspersión de citocininas es el retraso del amarillamiento de la lámina en trigo. El tratamiento con BAP permitió conservar del 60 % de la clorofila total respecto al valor en las hojas presenescentes (21 DDS), mientras que el testigo conservó sólo 8 % (Figura 1 A). Particularmente, en el testigo la cantidad

Release of electrolytes

The relative integrity of the plasma membrane was indirectly determined through the quantification of released electrolytes, modification of the methods described by Prášil and Zámeňnýk (1998) and Sánchez-Urdaneta *et al.* (2004). Electric conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$) was measured with a conductivity meter (Horiba b-173, Kyoto, Japan). Results were expressed in relative values (%).

Statistical analysis

Analysis of data was made through an Analysis of Variance and means were compared with Tukey test ($p \leq 0.05$) using the statistical software STATGRAPHICS Plus 4.

RESULTS AND DISCUSSION

Protein degradation was significant at 26 DAS; in contrast, the BAP treatment delayed the degradation of soluble proteins (Figure 1 B). Similar results were obtained in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.) transformed with the *ipt* gene encoding the enzyme isopentenyltransferase (IPT), under the control of the promoter of a specific gene of senescence, SAG 12 (Jordi *et al.*, 2000). In addition, BAP induced the accumulation of glucose and fructose at 31 and 36 DAS (Figure 3 A and B). The accumulation of these carbohydrates could be explained by the effect of cytokinins in the maintenance of CO_2 fixation during wheat leaf senescence (Wingler *et al.*, 1998; Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2008).

Photosynthetic pigments

One of the strongest evidence of the useful effect of cytokinin spraying is the delay of leaf yellowing. The BAP treatment retained 60 % of total chlorophyll in relation to the value of green presenescent leaves (21 DAS), while the control preserved only 8 % (Figure 1 A). In the control, the amount of Chl *a* underwent a greater impact than that of Chl *b* since the Chl *a*: Chl *b* ratio diminished from 3.7 to 1.3. In contrast, the leaves treated with BAP upheld values between 3.0 and 3.7, that is, during the delay of pigment degradation BAP maintained the proportion of Chl *a* and Chl *b*, a similar performance to that exhibited by the green leaf (Table 1).

In the present study it was found that BAP induced the carotenoid-xanthophyll synthesis ($c+x$) during the 26 DAS; then the values were constant but significantly higher than in the control (Table 1). A similar trend was reported by Zavaleta-Mancera *et al.* (2007) in fragments of wheat leaves incubated 6 d in BAP in the dark. On the contrary, under greenhouse conditions

de Chl *a* fue más afectada que la de Chl *b*, debido a que la razón Chl *a*: Chl *b* disminuyó de 3.7 a 1.3, en contraste, las hojas tratadas con BAP mantuvieron valores entre 3.0 y 3.7, es decir durante el retraso de la degradación de pigmentos, BAP mantuvo la proporción de chl *a* y chl *b* en forma similar que la hoja verde (Cuadro 1).

En el presente estudio se encontró que BAP indujo la síntesis de carotenoides + xantofilas (*c+x*) hasta los 26 DDS; luego los valores fueron constantes, pero significativamente más altos que en el testigo (Cuadro 1). Una tendencia similar fue reportada por Zavaleta-Manera *et al.* (2007) en fragmentos de hojas de trigo incubados 6 d en BAP en oscuridad. Por el contrario, en invernadero con iluminación natural, los pigmentos accesorios (*x+c*) aumentaron durante la senescencia natural de trigo Martínez-Gutiérrez *et al.* (2008). En esta misma especie, con altas intensidades de luz los pigmentos accesorios aumentan su contenido Lu *et al.* (2001). Es probable que las citocininas incrementen la síntesis de pigmentos accesorios para proteger a los centros de reacción de la luz y el oxígeno (Wingler *et al.*, 2004; Vlèková *et al.*, 2006).

Contenido de niveles de la subunidad grande de Rubisco (LSU)

Las citocininas inducen la expresión de genes fotosintéticos, promueven la síntesis de proteínas y mantienen altos niveles de Rubisco durante la senescencia foliar (Ookawa *et al.*, 2004). En plantas transgénicas P_{SAG12}-IPT de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), se demostró que los niveles de proteínas solubles (30 %) se conservan mejor que los de Rubisco (15 %) en las hojas senescentes (Jordi *et al.*, 2000). En contraste, en el presente estudio las hojas de trigo (*Triticum aestivum* L.) asperjadas con BAP conservaron un porcentaje mayor de LSU de Rubisco (50 %) que de proteínas solubles (44 %) a los 41 DDS respecto a los 21 DDS (Figura 1 B y Figura 2). Lo anterior evidencia las diferencias en la degradación de macromoléculas entre especies y tratamientos. Al respecto, Buchanan-Wollaston *et al.* (2005) documentan los resultados en la expresión de genes y en las vías de señalización comparando la senescencia natural y la inducida con oscuridad, resultados que mostraron no solo similitudes sino también diferencias, e inclusive la presencia de vías diferentes en procesos catabólicos, particularmente en la movilización de nitrógeno y de carbohidratos.

Azúcares solubles y almidón

Los resultados de este trabajo indicaron aumento en los contenidos de hexosas y sacarosa del d 21 al d

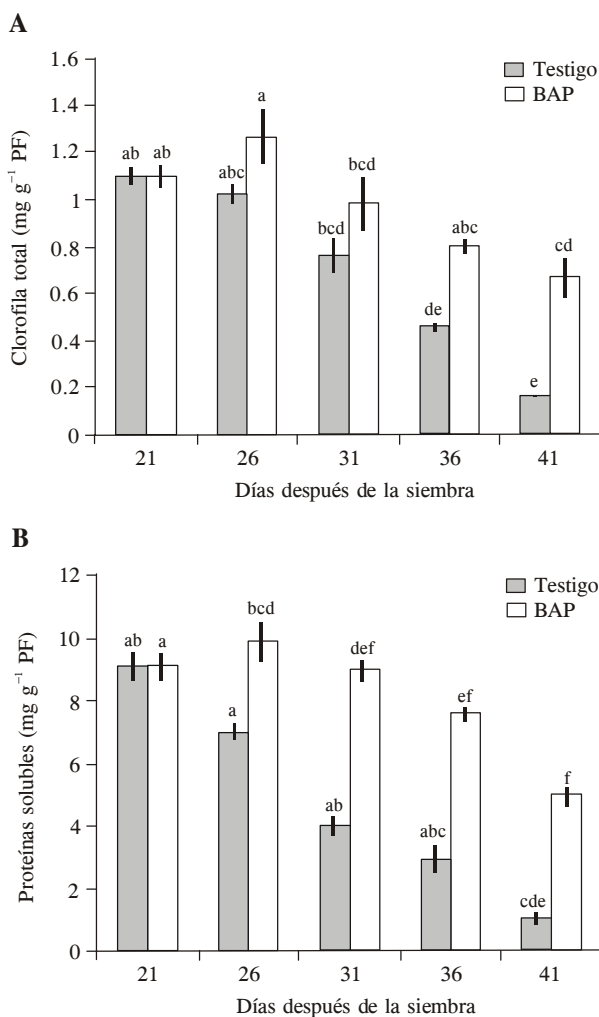


Figura 1. Concentración de A) clorofila total y B) proteínas solubles durante la senescencia natural de la segunda hoja de trigo, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua). Los datos son promedios \pm E.S. (n=4); medias con diferente letra en los días después de la siembra son diferentes ($p \leq 0.05$).

Figure 1. Concentration of A) total chlorophyll and B) soluble proteins during senescence of the second wheat leaf, sprayed with BAP (0.1 mM) and control solution (water). Data are means \pm SE (n=4). Letters, in the days after sowing (DAS) are different ($p \leq 0.05$).

with natural light, the accessory pigments (*c+x*) increased during wheat natural senescence (Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2008). In this same species, with intense light, accessory pigments increased their content (Lu *et al.*, 2001). Cytokinins are likely to increase the synthesis of accessory pigments to protect the reaction centers of light and oxygen (Wingler *et al.*, 2004; Vlèková *et al.*, 2006).

Cuadro 1. Contenido de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), carotenoides+xantofilas (c+x) y la razón Chl *a*:Chl *b* durante la senescencia de la segunda hoja de trigo, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua) cada tercer día a partir del 21 DDS.

Table 1. Content of chlorophyll *a* (Chl *a*), chlorophyll *b* (Chl *b*), carotenoids+xanthophylls (c+x) and ratio Chl *a*:Chl *b* during the senescence of the second wheat leaf sprayed with BAP (0.1 mM) and control solution (water) every other day as of 21 DAS.

DDS [†]	Chl <i>a</i> (mg g ⁻¹ PF)		Chl <i>b</i> (mg g ⁻¹ PF)		c+x (mg g ⁻¹ PF)		Razón Chl <i>a</i> :Chl <i>b</i>	
	Testigo	BAP	Testigo	BAP	Testigo	BAP	Testigo	BAP
21	0.87 ± 0.0 ab	0.87 ± 0.03 ab	0.23 ± 0.01 ab	0.23 ± 0.01 ab	0.34 ± 0.02 ab	0.34 ± 0.02 ab	3.7	3.7
26	0.73 ± 0.09 bc	0.97 ± 0.09 a	0.28 ± 0.06 abc	0.29 ± 0.01 a	0.27 ± 0.00 b	0.42 ± 0.04 a	2.5	3.4
31	0.52 ± 0.06 cd	0.76 ± 0.10 bcd	0.23 ± 0.03 ab	0.22 ± 0.01 bc	0.29 ± 0.02 ab	0.33 ± 0.02 ab	2.2	3.2
36	0.30 ± 0.12 de	0.60 ± 0.02 abc	0.15 ± 0.02 cd	0.19 ± 0.00 ab	0.23 ± 0.02 ab	0.30 ± 0.02 ab	1.9	3.1
41	0.09 ± 0.01 e	0.50 ± 0.07 cd	0.06 ± 0.02 d	0.16 ± 0.01 bc	0.04 ± 0.02 c	0.29 ± 0.04 ab	1.3	3.0

[†] DDS: días después de la siembra. Los datos son promedios ± E.S., n=4; medias con diferente letra en los DDS son diferentes (p≤0.05) ♦ DAS: days after sowing. Data are mean ± E.S., n=4; mean values with a different letter in DAS are different (p≤0.50).

36, pero después los azúcares disminuyeron; sin embargo, en el testigo los niveles se mantuvieron similares hasta los 36 DDS (Figuras 3 A, B, C y D).

El testigo mantuvo similares concentraciones de almidón durante la senescencia ($65.90 \pm 1.00 \mu\text{mol}$ glucosa g⁻¹ PF), en contraste las hojas con BAP aumentaron el contenido de almidón hasta el d 31 y luego disminuyó. Se encontraron diferencias (p≤0.05) entre las hojas con BAP y el testigo, a los 26 y 31 DDS (Figura 3 D). En *Nicotiana tabacum*, *Zea mays* y *Arabidopsis*, los azúcares solubles aumentan durante la senescencia natural (Wingler *et al.*, 1998; Jongebloed *et al.*, 2004; Pourtau *et al.*, 2006). Aún no es claro qué origina la acumulación de hexosas en hojas senescentes a pesar de la disminución de la actividad fotosintética (Wingler *et al.*, 2006) y tampoco se sabe en qué compartimentos celulares se acumulan las hexosas (Pourtau *et al.*, 2006). El aumento en hexosas se atribuye al rompimiento de almidón o a la exportación preferencial de N₂ (Wingler *et al.*, 1998). Otro estudio menciona que el aumento de azúcares en las hojas senescentes se debe a la aparición de tapones calosa en los tubos cribosos (Jongebloed *et al.* (2004).

Otros autores señalan que el incremento de los azúcares está correlacionado con la degradación de Rubisco, debido a la expresión de la aminopeptidasa CND41 (Parrot *et al.*, 2007). Los resultados del presente estudio no indican una relación entre la degradación de Rubisco y el aumento de azúcares en el testigo (senescente). Los mayores niveles de azúcares se observaron a los 31 DDS, mientras que los niveles de Rubisco disminuyeron significativamente 5 d antes (26 DDS). En contraste, a los 36 DDS las hojas con BAP acumularon azúcares y la cantidad de Rubisco disminuyó significativamente (25 %) comparado con las hojas presenescentes (21 DDS) (Figura 2 y Figuras 3 A, B).

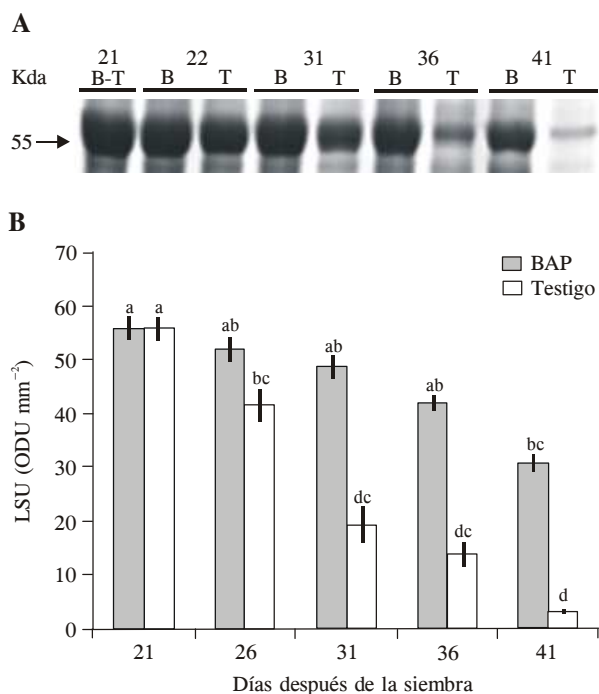


Figura 2. Contenido de la subunidad grande (LSU) de Rubisco. A) Perfil electroforético SDS-PAGE de proteínas de la segunda hoja de trigo con BAP (B) y solución testigo (T), días después de la siembra (DDS). B) Cuantificación del contenido de LSU por análisis densitométrico (ODU mm⁻²). Los datos son promedios ± E.S., n=4, medias con diferente letra en los DDS son estadísticamente diferentes (p≤0.05).

Figure 2. Content of the Rubisco large subunit (LSU). A) Electrophoretic profile SDS-PAGE of proteins of the second leaf of wheat with BAP (B) and control solution (T), days after sowing (DAS). B) Quantification of LSU content by densitometric analysis (ODU mm⁻²). Data are mean ± E.S., n=4, mean values with a different letter in DAS are statistically different (p≤0.05).

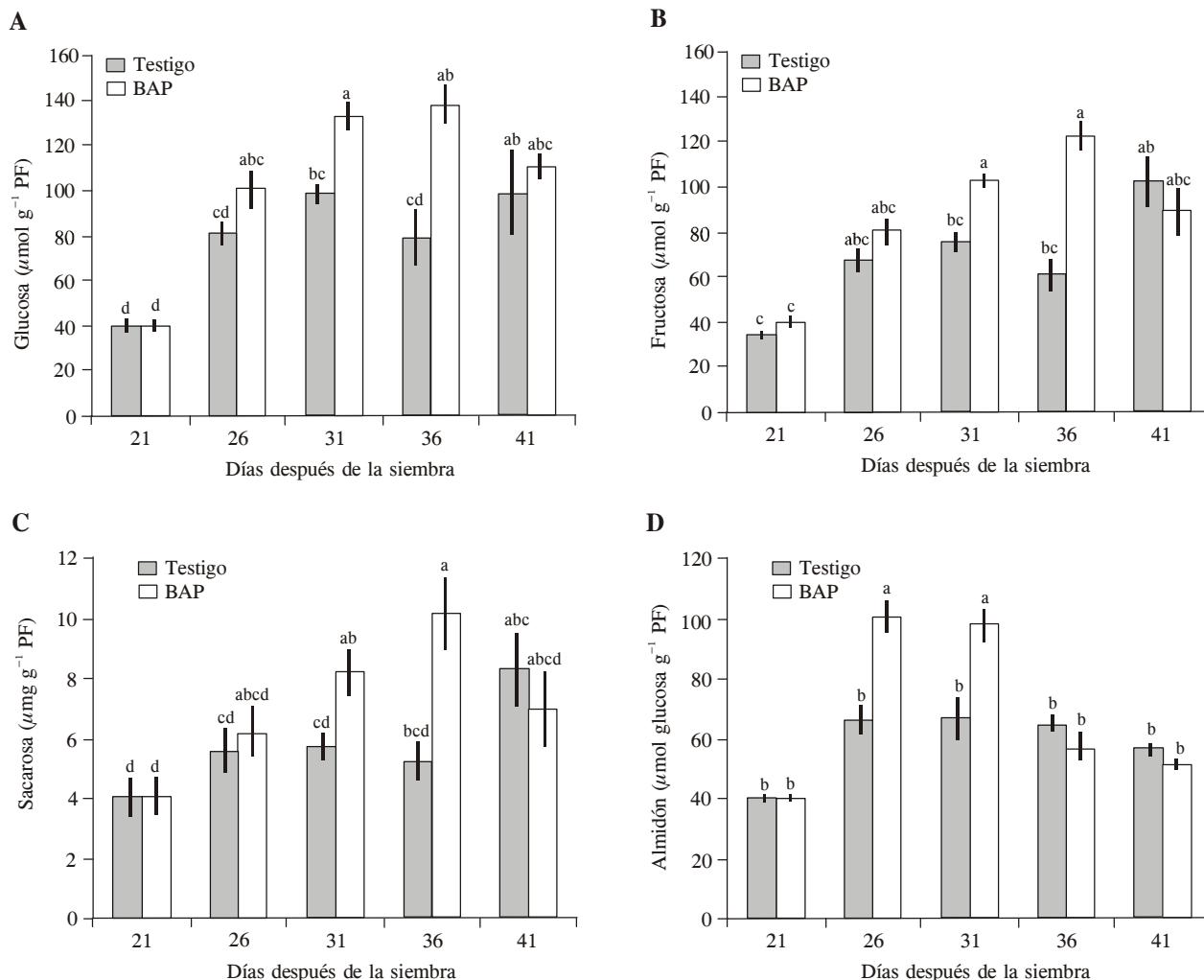


Figura 3. Concentración de glucosa (A), fructosa (B), sacarosa (C) y almidón (D) durante la senescencia foliar de trigo, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua). Los datos son promedios \pm E.S. (n = 4), medias con diferente letra en los días son diferentes ($p \leq 0.05$).

Figure 3. Concentration of glucose (A), fructose (B), sucrose (C) and starch (D) during wheat leaf senescence sprayed with BAP (0.1 mM) and control solution (water). Data are mean \pm E.S. (n=4), mean values with different letter in the days are different ($p \leq 0.05$).

La aspersión externa de BAP promovió la acumulación de azúcares. Al respecto, Wingler *et al.* (1998) y Jordi *et al.* (2000) señalan que el incremento de los azúcares se requiere para permitir el retraso de la senescencia en plantas transgénicas de tabaco (PSAG12-IPT). Se menciona que las citocininas regulan la expresión de ciertos genes implicados en el reparto de asimilados y en la regulación de la fuente-demanda como la expresión de la invertasa extracelular y de transportadores de hexosas, que aumentan la utilización de los carbohidratos para impedir el inicio de los procesos catabólicos (Balibrera-Lara *et al.*, 2004; Guivarc'h *et al.*, 2005).

Content of the levels of the Rubisco large subunit (LSU)

Cytokinins induce the expression of photosynthetic genes, promote the synthesis of proteins and keep high levels of Rubisco during leaf senescence (Ookawa *et al.*, 2004). In transgenic plants P_{SAG12} -IPT of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) it was shown that soluble proteins (30 %) register better preservation levels than those of Rubisco (15 %) in senescent leaves (Jordi *et al.*, 2000). In contrast, in the present study, the wheat leaves (*Triticum aestivum* L.) sprayed with BAP preserved a higher percentage of Rubisco LSU (50 %)

Actividad de PEPCK y PEPC

En este trabajo se encontró actividad de PEPCK y PEPC durante la senescencia de hojas de trigo, gramínea con metabolismo C_3 . Las hojas tratadas con BAP tuvieron valores de actividad de PEPCK mayores ($p \leq 0.05$) que el testigo, siendo más marcada entre los 36 y 41 DDS (Figura 4 A). Respecto a la actividad de PEPC, a pesar de que tuvo una tendencia a disminuir gradualmente, las hojas tratadas con BAP mantuvieron valores mayores que el testigo (Figura 4 B).

Algunas de las funciones principales de PEPCK están relacionadas con la descarboxilación del oxalacetato dentro de un subgrupo de las plantas C_4 y su intervención en la gluconeogénesis durante la germinación de semillas. Sin embargo, PEPCK se ha localizado en diferentes tejidos de plantas, incluyendo aquellas del subgrupo de las NADP-ME de las plantas C_4 , frutos, tricomas, canales de resina, raíces, semillas en desarrollo, en haces vasculares y en hojas de plantas C_3 como pepino (*Cucumis sativus*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Walker *et al.*, 2001; Leegood y Walker, 2003). La PEPCK se encuentra presente en hojas senescentes de pepino (*Cucumis sativus*) (C_3), distribuida principalmente en el floema y en los tricomas. La asociación de PEPCK a los haces vasculares, en esta especie, sugiere que está involucrada en el transporte de aminoácidos, regulación del pH con una función cataplérotica para regular la presencia de oxalacetato en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) durante la síntesis de aminoácidos (Chen *et al.*, 2000). Se propone que PEPCK, PEPC y el ciclo TCA, están involucrados en la síntesis de glutamina, principal aminoácido transportable en la senescencia foliar natural (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). También se señala que el reciclamiento de nitrógeno en las hojas senescentes de trigo involucra un sistema coordinado entre el citosol y peroxisomas, en donde intervienen diferentes enzimas, entre ellas PEPC, isocitrato deshidrogenasa, aconitato hidratasa y citrato sintetasa (Gregersen y Holm, 2007). La PEPC está presente también en hojas de las plantas C_3 no senescentes y se le atribuyen funciones anapleróticas, porque proporciona los esqueletos carbonados para la biosíntesis de aminoácidos y regula el pH (Häusler *et al.*, 2002). La estrecha relación de PEPC con el metabolismo de nitrógeno fue demostrada por Duff y Chollet (1995), quienes observaron que la actividad de PEPC aumentó en fragmentos de hojas de trigo incubados en NO_3^- y luz. Es probable que el tratamiento con BAP promueva la actividad de PEPCK y PEPC para regular el pH debido a que las hojas disminuyen la translocación de compuestos nitrogenados (Jordi *et al.*, 2000); pero requieren mantener un pH óptimo en las células para las

than of soluble proteins (44 %) 41 DAS compared to 21 DAS (Figure 1 B and Figure 2). This evidences the differences in the degradation of macromolecules between species and treatments. In this respect, Buchanan-Wollaston *et al.* (2005) document the results on the gene expression and the signaling pathways comparing natural senescence and the one induced with darkness, all of which showed both similarities and differences, including the presence of different channels in catabolic processes, especially in the mobilization of nitrogen and carbohydrates.

Soluble sugars and starch

The results of this study indicated an increase in the content of hexoses (glucose and fructose) and sucrose from d 21 to d 36, later sugars decreased; however, in the control the levels were similar until 36 DAS (Figures 3 A, B, C and D).

The control recorded similar concentrations of starch during senescence ($65.90 \pm 1.00 \mu\text{mol glucose g}^{-1} \text{PF}$); in contrast leaves sprayed with BAP registered a higher content of starch until d 31, and then dropped. Differences were detected ($p \leq 0.05$) between the leaves with BAP and the control, 26 and 31 DAS (Figure 3 D). In *Nicotiana tabacum*, *Zea mays* and *Arabidopsis*, soluble sugars increased during natural senescence (Wingler *et al.*, 1998; Jongebloed *et al.*, 2004; Pourtau *et al.*, 2006). It is not yet clear what causes the accumulation of hexoses in senescent leaves despite a visible fall of photosynthetic activity (Wingler *et al.*, 2006), nor in which cellular compartments hexoses accumulate (Pourtau *et al.*, 2006). The increase of hexoses is attributed to the breaking of starch or the preferential export of N_2 (Wingler *et al.*, 1998). According to another study, the increase of sugars in senescent leaves is due to the appearance of callose deposits in the sieve tubes (Jongebloed *et al.*, 2004).

Other authors point out that the sugar increase is correlated to the degradation of Rubisco, resulting from the expression of aminopeptidase CND41 (Parrot *et al.*, 2007). The data presented in this paper show no relation between the degradation of Rubisco and the sugar rise in the control (senescent). The highest levels of sugars were observed 31 DAS, while the Rubisco levels significantly dropped 5 d before (26 DAS). In contrast, 36 DAS leaves sprayed with BAP accumulated sugars and the amount of Rubisco substantially diminished (25 %) compared to presenescent leaves (21 DAS) (Figure 2 and Figures 3 A, B).

The BAP external spraying promoted the accumulation of sugars. In this respect, Wingler *et al.* (1998) and Jordi *et al.* (2000) assert that an increment

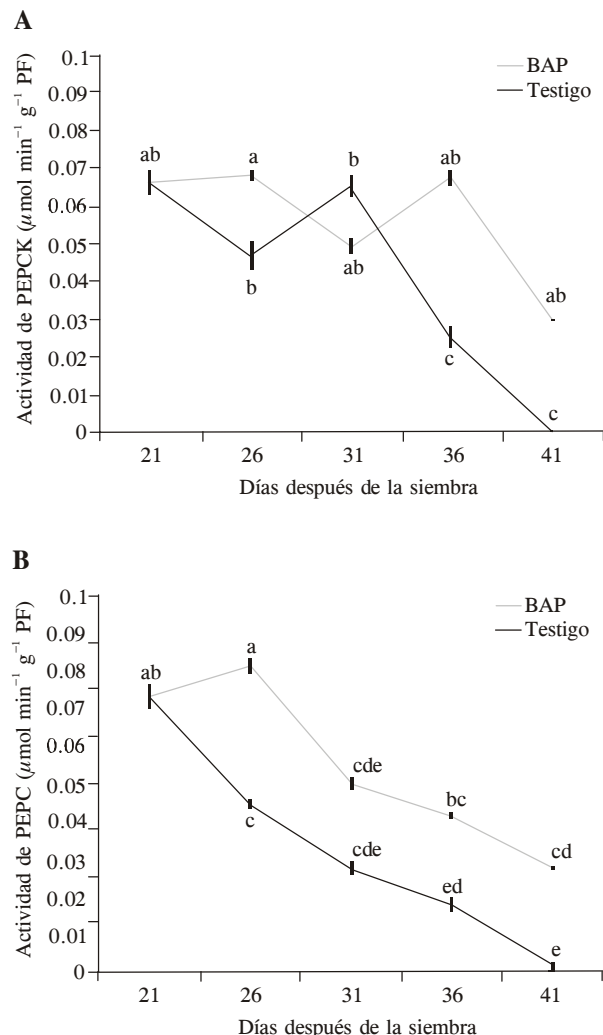


Figura 4. Actividad de PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxinasa (A) y PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa (B) durante la senescencia foliar de trigo, asperjada con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua). Los datos son promedios \pm E.S. (n=4), medias con diferente letra en los días son diferentes ($p \leq 0.05$).

Figure 4. Activity of PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase (A) and PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase (B) during wheat leaf senescence, sprayed with BAP (0.1 mM) and control solution (water). Data are mean \pm E.S. (n=4), mean values with different letter in the days are different ($p \leq 0.05$).

reacciones bioquímicas y fisiológicas del metabolismo.

Permeabilidad de la membrana

Durante la senescencia foliar, la membrana plasmática y las membranas de otros organelos pierden su permeabilidad debido a las modificaciones moleculares de la bicapa de lípidos, promovida inicialmente

of sugars is required to allow the delay of senescence in transgenic tobacco plants (PSAG12-IPT). Cytokinins regulate the expression of certain genes involved in the distribution of assimilates and in the regulation of the source-sink, like the expression of the extracellular invertase and hexose carriers that increase the use of carbohydrates to impede the start of catabolic processes (Balibrera-Lara *et al.*, 2004; Guivarc'h *et al.*, 2005).

PEPCK and PEPC activity

Activity of PEPCK and PEPC was found during the senescence of wheat leaves, gramineae with C_3 metabolism. Leaves treated with BAP registered higher PEPCK activity values ($p \leq 0.05$) than the control, being even more accentuated between 36 and 41 DAS (Figure 4A). As to PEPC activity, though it tended to diminish gradually, the leaves treated with BAP kept higher values of this activity than the control (Figure 4 B).

Some of the main functions of PEPCK are associated with the decarboxylation of oxalacetate within a subgroup of C_4 plants and its intervention in gluconeogenesis during the germination of seeds. However, PEPC has been found in different plant tissues including those of the NADP-ME subgroup of the C_4 plants, fruits, trichomes, resin channels, roots, developing seeds in vascular bundles and leaves of C_3 plants like cucumber (*Cucumis sativus*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*) (Walker *et al.*, 2001; Leegood and Walker, 2003). The PEPC is present in cucumber senescent leaves (*Cucumis sativus*) (C_3), distributed mostly in the phloem and trichomes. The association of PEPCK with vascular bundles in this species suggests it participates in the transport of amino acids, the regulation of pH with a cataplerotic function to regulate the presence of oxalacetate in the cycle of tricarboxylic acids (TCA) during amino acid synthesis (Chen *et al.*, 2000). The proposal is that PEPCK, PEPC and the TCA cycle are involved in the glutamine synthesis, the main transportable amino acid in natural leaf senescence (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). It is also pointed out that nitrogen recycling in wheat senescent leaves involves a coordinated system between cytosol and peroxisomes where different enzymes take part, among them/including PEPC, isocitrate dehydrogenase, aconitate hydratase and citrate synthetase (Gregersen and Holm, 2007). The PEPC is also present in the non senescent C_3 plant leaves and is thought to perform anaplerotic functions because it provides carbon skeletons for the biosynthesis of amino acids and regulates pH (Häusler *et al.*, 2002). The close relation of PEPC with nitrogen metabolism was proven by Duff and Chollet (1995), who observed that PEPC activity

por procesos oxidativos (Hopkins *et al.*, 2007). Pero, las citocininas retrasan este proceso natural; al aumentar de la actividad de enzimas antioxidantes catalasa y ascorbato peroxidada, las membranas citoplasmática y del cloroplasto se protegen a del daño oxidativo, evidenciado por la reducción en la pérdida de electrolitos y el mantenimiento de la estructura de las membranas cloroplásticas (Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007). En el reverdecimiento de *Nicotiana rustica* L, BAP promueve el reensamblaje de las membranas tilacoidales en cloroplastos envejecidos ó gerontoplastos (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999). Los resultados del presente estudio indican que la liberación de electrolitos (17%) se mantuvo sin cambios ($p \leq 0.05$) en las hojas con BAP y en el testigo del d 21 al d 36 (Figura 5). Pero a los 41 DDS aumentó la liberación de electrolitos en el testigo (32%), este valor indica daño a la membrana citoplasmática (Figura 5). En segmentos de hojas de *Catharanthus roseus* L. la liberación de electrolitos se mantuvo constante por 10 d, pero cuando fueron incubados en BAP, ocurriendo cambios significativos solo en los últimos días del tratamiento (Zhang *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

La citocinina BAP, además de mantener por más tiempo las concentraciones de clorofila, proteínas solubles totales y la Rubisco, puede modificar la actividad enzimática de PEPC y PEPCK, conservando un alto contenido de azúcares y reduciendo la pérdida de electrolitos. El entendimiento del retraso de la senescencia foliar puede proporcionar información para implementar tecnologías en la manipulación de la senescencia de forrajes, hortalizas verdes y de ornamentales de follaje.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (Proyecto SEP-CONACYT 43866/A-1).

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Becerril, G. y C. B. Peña-Valdivia. 2006. Alteraciones fisiológicas provocadas por sequía en nopal (*Opuntia ficus-indica*). *Fitotec. Mex.* 29: 231-237.
- Balibrera-Lara, M. E., M. C González-García, F. Tahira, R. Eheña, T. K. Lee, R. Proles, W. Tanner, and T. Roitsch. 2004. Extracellular invertase in an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *The Plant Cell* 16: 1276-1287.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* 72: 248-59.
- Buchanan-Wollaston, V., T. Page, E. Harrison, E. Breeze, P. O. Lim, H. G. Nam, J-F. Lin, S-H. Wu, J. Swidsinski, K. Ishizaki,

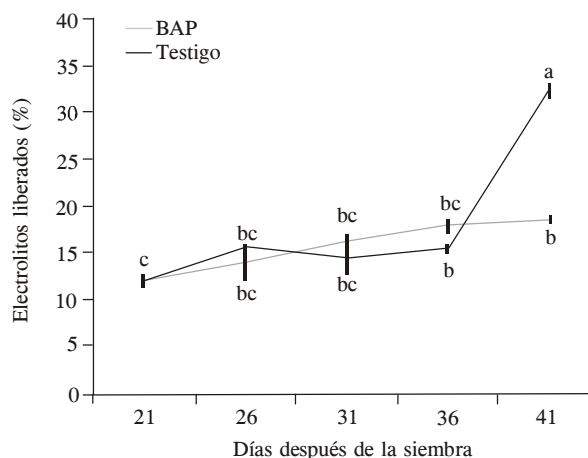


Figura 5. Liberación de electrolitos (%) durante la senescenciafoliar de trigo, con BAP (0.1 mM) y solución testigo (agua). Los datos son promedios \pm E.S. (n=4), medias con diferente letra en los días son diferentes ($p \leq 0.05$).

Figure 5. Release of electrolytes (%) during wheat leaf senescence, with BAP (0.1 mM) and control solution (water). Data are mean \pm E.S. (n=4), mean values with different letter in the days are different ($p \leq 0.05$).

increased in fragments of wheat leaves incubated in NO_3 and light. The BAP treatment is likely to promote PEPCK and PEPC activity to regulate pH since leaves reduce the translocation of nitrogen compounds (Jordi *et al.*, 2000); but they require to maintain an optimum pH in cells for the biochemical and physiological reactions of metabolism.

Membrane permeability

During leaf senescence, the plasma membrane and the membranes of other organelles lose their permeability due to molecular modifications of the lipid bilayer, initially promoted by oxidative processes (Hopkins *et al.*, 2007).

But cytokinins delay this natural process. By increasing the activity of the antioxidant enzymes catalase and ascorbate peroxidase, cytoplasmatic and chloroplast membranes protect themselves from the oxidative damage, evidenced by the reduced loss of electrolytes and the preservation of the chloroplast membrane structure (Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007). In the regreening process of *Nicotiana rustica* L, BAP promotes the reassembly of tilacoidal membranes in aged chloroplasts or gerontoplasts (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999). The data of the present study indicate that the release of electrolytes (17%) remained unchanged ($p \leq 0.05$) in the leaves treated with BAP and the control from d 21 to d 36 (Figure 5). But 41

- and C. J. Leaver. 2005. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 42: 567-585.
- Chen, Z-H., R. P. Walker, R. M. Acheson, L. I. Técsi, A. Wingler, P. J. Lea, and R. C. Leegood. 2000. Phosphoenolpyruvate carboxykinase in cucumber plants is increased both by ammonium and by acidification, and is present in the phloem. *Planta* 219: 48-58.
- Delgado-Alvarado, A., R. P. Walker, and R. C. Leegood. 2007. Phosphoenolpyruvate carboxykinase in developing pea seeds is associated with tissues involved in solute transport and is nitrogen-responsive. *Plant Cell Environ.* 30: 225-235.
- Duff, M. G. and R. Chollet. 1995. In vivo regulation of wheat-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation. *Plant Physiol.* 107: 775-782.
- Guivarc'h, A., J. Rembur, M. Gotees, T. Roitsch, M. Noin, T. Schmülling, and D. Chriqui. 2005. Local expression of the *ipt* gene in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.C. SR1) axillary buds establishes a role for cytokinins in tuberization and sink formation. *J. Exp. Bot.* 53: 621-629.
- Häusler, R. E., H. J. Hirsch, F. Kreuzaler, and C. Peterhänsel. 2002. Over expression of C_4 -cycle enzymes in transgenic C_3 plants: a biotechnological approach to improve C_3 -photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 53: 591-607.
- Hopkins, M., C. Taylor, Z. Liu, F. Ma, L. McNamara, T-W. Wang, and J. E. Thompson. 2007. Regulation and execution of molecular disassembly and catabolism during senescence. *New Phytol.* 175: 201-214.
- Jongbloed, U., J. Szederkényi, K. Hartig, C. Schobert, and E. Komor. 2004. Sequence of morphological and physiological events during natural ageing of castor bean leaf: sieve tube occlusions and carbohydrate back-up precede chlorophyll degradation. *Physiol. Plantarum* 120: 338-346.
- Jordi, W., A. Schapendonk, E. Davelaar, G. M. Stoopen, C. S. Pot, R. De Visser, J. A. Van Rhijn, S. Gan, and R. M. Amasino. 2000. Increased cytokinin levels in transgenic P_{SAG12} -IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *Plant Cell Environ.* 23: 279-289.
- Kim, H.J., H. Ryu, S. H. Hong, H. R. Woo, P. O. Lim, I. C. Lee, J. Sheen, H. G. Nam and I. Hwang. 2006. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 103:814-19
- Leegood, R. C. and R. P. Walker. 2003. Regulation and roles of phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 414: 204-210.
- Lichtenthaler, H. K. and A. R. Wellburn. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b in leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11: 591-592.
- Lim, P. O., H. J. Kim, and H. G. Nam. 2007. Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 115-136.
- Lu, C., Q. Lu, A. J. Zhang, and T. Kuang. 2001. Characterization of photosynthetic pigment composition, photosystem II photochemistry and thermal energy dissipation during leaf senescence of wheat plants grown in the field. *J. Exp. Bot.* 52: 1805-1810.
- Makino, A., M. Tadahiko, and O. Koji. 1986. Colorimetric measurement of protein stained with coomassie brilliant blue R on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis by eluting with formamide. *Agric. Biol. Chem.* 50: 1911-1912.
- Martínez-Gutiérrez, R., H. Zavaleta-Mancera, L. Ruíz-Posadas, A. Delgado-Alvarado y R. Vaca-Paulín. 2008. Intercambio de gases y relaciones hídricas durante el retraso de la senescencia foliar de trigo (*Triticum aestivum* L.) por la citocinina BAP. *Interciencia* 33: 140-145.
- DAS the release of electrolytes rose in the control (32%), a value that reveals there is damage in the cytoplasmic membrane (Figure 5). In segments of leaves of *Catharanthus roseus* L. the release of electrolytes remained constant for 10 d, but when they were incubated in BAP, significant changes occurred only in the last days of the treatment (Zhang *et al.*, 2007).

CONCLUSIONS

The cytokinin BAP keeps chlorophyll concentrations longer, as well as total soluble proteins and Rubisco; it can also modify the enzymatic activity of PEPC and PEPCK, preserving a high content of sugars and reducing the loss of electrolytes. Understanding the delay of leaf senescence may lead to provide information for the implementation of technologies to address the senescence of fodder, green vegetables and ornamental foliage.

End of the English version—



- Masclaux, C., M. H. Valadier, N. Brugière, J. F. Morot-Gaudry, and B. Hirel. 2000. Characterization of the sink/source transitions in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoot in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* 211: 510-518.
- McCabe, M., L. C. Garratt, F. Schepers, J. R. M. Jordi, G. M. Stoopen, E. Davelaar, J. H. van Rhijn, J. B. Power, and M. R. Davey. 2001. Effects of P_{SAG12} -IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiol.* 127: 505-516.
- Ookawa, T., Y. Naruoka, A. Sayama, and T. Hirasawa. 2004. Cytokinin effects on ribulose 1-5 biphosphate carboxylase/oxygenase and nitrogen partitioning in rice during ripening. *Crop Sci.* 44: 2107-2115.
- Parrot, D. L., K. McInnerney, U. Feller, and A. M. Fisher. 2007. Steam-girdling of barley (*Hordeum vulgare*) leaves leads to carbohydrate accumulation and accelerated leaf senescence, facilitation transcriptomic analysis of senescence-associated genes. *New Phytol.* 176: 56-69.
- Pourtau, N., R. Jennings, E. Pelzer, J. Pallas, and A. Wingler. 2006. Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta* 224: 556-568.
- Prášil, I. and J. Zámeňník. 1998. The use of conductivity measurement method for assessing freezing injury. I. Influence of leakage time, segment number, size and shape in a sample on evaluation of the degree on injury. *Environ. Exp. Bot.* 40: 1-10.
- Roitsch, T. and R. Ehneš. 2000. Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Reg.* 32: 359-367.
- Sánchez-Urdaneta, A. B., C. B. Peña-Valdivia, J. R. Aguirre, y R. C. Trejo. 2004. Efectos del potencial de agua en el crecimiento radical de plántulas de *Agave salmiana* Otto. *Interciencia* 29: 626-631.
- Sholes, J. D., P. J. Lee, P. Horton, and D. H. Lewis. 1994. Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytol.* 126: 213-222.

- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. Sixth Int. Congr. On Soilless Culture. ISOSC Proceeding. The Netherlands. pp: 663-649.
- Vlèková, A., M. Špundová, E. Kotabová, R. Novotný, K. Doležal, and J. Nauš. 2006. Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light. *Physiol. Plantarum* 126: 257-267.
- Walker, R. P., Z-H. Chen, K. E. Johnson, F. Famiani, L. Tecsí, and R. C. Leegood. 2001. Using immunohistochemistry to study plant metabolism: the examples of its use in the localization of amino acids in plant tissues, and of phosphoenolpyruvate carboxykinase and its possible role in pH regulation. *J. Exp. Bot.* 52: 565-576.
- Wingler, A., A. von Schaewen, R. C. Leegood, P. J. Lea, and W. P. Quick. 1998. Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugar, and light. Effects on NADH-depend hydroxypyruvate reductase. *Plant Physiol.* 116: 329-335.
- Wingler, A., M. Marès, and N. Pourtau. 2004. Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 57: 391-399.
- Wingler, A., S. Purdy, J. A. MacLean, and N. Pourtau. 2006. The role of sugar in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 57: 391-399.
- Zavaleta-Mancera, H. A., H. López-Delgado, H. Loza-Tavera, M. Mora-Herrera, C. Trevilla-García, M. Vargas-Suárez, and H. Ougham. 2007. Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *J. Plant Physiol.* 164: 1572-1582.
- Zavaleta-Mancera, H. A., B. J. Thomas, H. Thomas, and I. M. Scott. 1999. Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. II. Redifferentiation of plastids. *J. Exp. Bot.* 50: 1683-1689.
- Zhang, L., D. Xiang, J. Wang, and L. Li. 2007. Rapid and non-invasive detection of plants senescence using a delayed fluorescence technique. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6: 635-641.