

INCLUSIÓN Y ACUMULACIÓN DE Na^+ EN DIFERENTES ÓRGANOS DE LA VARIEDAD DE TRIGO CUBA-C-204 COMO RESPUESTA AL ESTRÉS SALINO

Leandris Argente^{1,2}, Jaime Garatuza Payán²; Enrico Yépez González², Jorge González Aguilera³

RESUMO - Se determinó la capacidad de inclusión y los sitios de retención de cationes en una variedad de trigo harinero Cuba-C-204, como posible indicador de toxicidad iónica y daño celular después de tratamiento salino, mediante técnicas de espectrofotometría de absorción atómica, fijación y microanálisis en diferentes órganos de la planta. Plantas fueron cultivadas por 35 días en condiciones de hidroponía en solución nutritiva con dos tratamientos (salinizada y control, con 88 mM de NaCl y sin NaCl, respectivamente). Se cuantificó el contenido catiónico en raíces, vainas y hojas, y en una muestra aleatoria de cada órgano seccionado. Como resultado del tratamiento salino observase que hubo mayor acumulación de Na^+ y Ca^{2+} en los diferentes órganos. En la parte de la raíz más próxima al tallo, y en la base y parte media de la vaina se observó inclusión y concentración significativas de Na^+ . En la hoja el Na^+ se acumuló en la parte más próxima a la lígula y el ápice, estando ausente en la parte media de la hoja. La mayor interferencia nutricional obtenida fue Na^+/K^+ en las vainas de las hojas, con una relación iónica media de 0.45. El contenido de Ca^{2+} en todos los casos fue superior en las plantas que crecieron en el medio salino y su concentración aumentó desde la raíz hasta las hojas. Existió congruencia entre los análisis espectrofotométricos y lo observado por microscopía electrónica. Los resultados obtenidos permiten aumentar el conocimiento que se tiene de la variedad como fuente de resistencia al estrés salino.

Palabras clave: contenido iónico, salinidad, espectrofotometría, microanálisis

INCLUSION AND ACCUMULATION Na^+ IN DIFFERENT ORGANS OF WHEAT VARIETY CUBA-C-204 IN RESPONSE TO SALT STRESS

ABSTRACT - It was determined the ability of inclusion and retention sites of cation mainly of Na^+ in Cuba-C-204 bread wheat variety as a possible indicator of ionic toxicity and cellular damage, using atomic absorption spectrophotometry, fixing and microanalysis techniques in different organs of the plant. Plants were grown for 35 days under hydroponics nutrient solution with two treatments (salinized and control, with 88 mM and without NaCl, respectively). The cation content in roots, veins and leaves, and a random sample of each severed organ was quantified. As a result of saline treatment observed there was greater accumulation of Na^+ and Ca^{2+} in different organs. In the part closest to the root stalk, and the middle base and the sheath portion and including significant Na^+ concentration was observed. In the leaves, the Na^+ accumulated in the part closest to the ligule and tip, however, not accumulated in the middle of the leaf. Most nutritional interference was obtained Na^+/K^+ in the leaf sheaths, with an average ratio of 0.45 ionic. The content of Ca^{2+} in all cases was higher in plants grown in saline and its concentration increased from the roots to the leaves. There was consistency between the spectrophotometric analysis and by electron microscopy was observed. The results allow to increase the knowledge we have of the variety as a source of resistance to salt stress.

Keywords: ion content, salinity, spectrophotometry, microanalysis

¹ Universidad de Granma, Carretera a Manzanillo, Km 17 ½ Peralejo. Bayamo. Cuba C.P. 85100. Email: oleinismora@gmail.com

² Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 Sur, Col. Centro, C.P. 85000, Cd. Obregón, Sonora. México. E-mail: garatuza@itson.edu.mx

³ Embrapa Trigo, Rodovia BR 285, Km 294 Caixa Postal 451 99001-970 Passo Fundo - RS. Email: j51173@yahoo.com



1. INTRODUCCIÓN

La concentración de iones en las células de las plantas resulta muy importante para poder asegurar la nutrición mineral y un potencial de solutos lo suficientemente bajo que le permita la absorción activa de agua cuando el potencial hídrico del suelo es bajo por la presencia excesiva de sales en el complejo absorbente del suelo (Munns & Gilliham, 2015). Sin embargo, cuando la concentración de algunas sales, por ejemplo Na^+ , es alta en los tejidos vegetales se producen efectos que afectan la funcionalidad bioquímica (Argentel et al., 2014), fisiológica (Argentel et al., 2013) y la productividad de la planta (Argentel et al., 2008).

Cultivos importantes como el trigo (*Triticum aestivum* L.) están siendo objeto de investigación para mejorar su adaptación en áreas afectadas por el estrés salino y obtener una mejora genética que permita una mayor selectividad de las membranas durante el proceso de inclusión iónica. Para la mayoría de los cultivos altas concentraciones de sales afectan el transporte osmótico, a partir del cual deviene un déficit nutricional y cuando la interferencia iónica con los elementos nutritivos es muy alta, ocurre, entonces, la toxicidad iónica (Argentel et al., 2013). Fisiológicamente, en condiciones de toxicidad iónica se afectan los procesos vitales de los distintos órganos y tejidos como la actividad enzimática, la funcionalidad de las membranas (transporte y selectividad) (Munns & Gilliham, 2015), disminución de la actividad fijadora del carbono como proceso importante de la fotosíntesis (Argentel et al., 2014), aceleración de la respiración y el consumo energético como modo de compensar el estrés (Jacoby et al., 2011), y finalmente todo repercute en la disminución de la productividad (Argentel et al., 2008).

Se han reportado y empleado numerosos métodos que permiten mostrar la composición de sales en las plantas, entre los que se podría citar la fotometría de llama y de absorción molecular entre otros. Estos métodos permiten cuantificar el contenido de los iones osmóticamente activos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}), pero no todos los resultados obtenidos son precisos, o no ofrecen una conclusión que permita explicar procesos y mecanismos fisiológicos y bioquímicos como respuesta a una condición de estrés como la salinidad, en muchas ocasiones (Benderradji et al., 2011).

La espectrofotometría de absorción atómica permite cuantificar iones en una muestra vegetal. Sin embargo,

en ocasiones al pasar los iones de un órgano a otro, se dificulta considerablemente entender el camino que estos iones recorren a través de la planta cuando se realiza la suma total respecto al total absorbido, viéndose alterada la cuantificación total (Shi et al., 2015). Esto impone la necesidad de explorar, con técnicas y herramientas más precisas como el microscopio electrónico, consiguiendo con este tener una mejor visión de hasta qué órgano llegan y se acumulan las sales y como se forman vacuolas acumulativas para evitar el daño celular y realizar el ajuste osmótico sin afectaciones severas a otros órganos y tejidos. Por ello, el estudio de la concentración y la acumulación de estas sales en el interior de las plantas, una vez sometidas a condiciones de estrés, pudiera ser un rasgo importante de tolerancia que permitiría explicar mecanismos que, aunque existe cierto grado de esclarecimiento, aún no están del todo descritos, como la inclusión y exclusión iónica.

Por la importancia de la producción de cereales y en particular el trigo, realizar estudios que permitan discernir todos aquellos factores que afectan y limitan la producción en determinados ambientes es de suma importancia, si consideramos que en la actualidad el incremento de sales y la conductividad eléctrica del extracto de saturación del suelo es una de las principales limitaciones que la cultura enfrenta (Tuberosa et al., 2011) donde la búsqueda por germoplasma resistente es una de las prioridades de los mejoradores.

El presente trabajo contiene parte de los resultados de un estudio realizado en la variedad de trigo Cuba-C-204 sometida a estrés salino en condiciones de solución nutritiva en invernadero, con los objetivos a evaluar el grado de inclusión iónica y su localización en diferentes órganos. La importancia del trabajo radica en que esta variedad posee un buen potencial genético productivo y gran capacidad de ajuste osmótico sin daño celular significativo, aún en suelos salinos, considerada como un importante progenitor para la mejora genética para dicho carácter y un modelo para entender los mecanismos que la planta desenvuelve en estas condiciones de estrés.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo empleamos la variedad de trigo de invierno primaveral cubana Cuba-C-204, primera variedad obtenida en Cuba por selección en el Instituto de Investigaciones Fundamentales de Agricultura

Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT) a partir de la variedad brasileña de trigo harinero “BH-1146”. Entre sus principales características se encuentran su alta productividad con poca exigencia de horas frío (unidades de calor) y su ciclo biológico precoz de 90 días determinado por Argentel et al. (2008).

Condiciones experimentales

El experimento fue conducido en condiciones de hidroponía en un invernadero perteneciente al laboratorio de Fisiología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias “Jorge Dimitrov”, Bayamo, Cuba. Se establecieron dos variantes experimentales [salinizado (88 mM de NaCl, conductividad eléctrica (CE) de 8 dS.m⁻¹ y presión osmótica de 0.27 MPa) y control (CE de 0.36 dS.m⁻¹ y presión osmótica de 0.076 MPa sin adición de NaCl)] siguiendo un diseño experimental completamente aleatorizado con cuatro repeticiones.

Solución nutritiva descrita por Hoagland & Arnon (1950) fue empleada, usando un volumen inicial de 5 L y ajustado diariamente el pH a 6.0. Un total de 80 semillas por tratamiento, de ellas 20 por repetición, fue empleado. Bandejas plásticas rectangulares transparentes de 50x39x20 cm de largo, ancho y altura respectivamente fueron empleadas, cubiertas con papel aluminio para evitar la entrada lateral de luz (Figura 1). La aireación de las soluciones, en cada bandeja, se realizó con bombas aireadoras (MELLIN 2.8) que distribuían el aire a cada bandeja con mangueras plásticas

transparentes de 3 mm de diámetro. Las bandejas fueron mantenidas en invernadero con fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad.

Contenido iónico en diferentes órganos

Al término de 35 días posteriores a la germinación, se tomaron de forma aleatoria 10 plantas completas por repetición en cada tratamiento hasta obtener una masa fresca de 5.10g de raíces e igual cantidad de la parte aérea, separadas en vainas y hojas. Después de determinar el peso fresco de las muestras, se lavaron con agua destilada y se introdujeron en bolsas de papel para su secado en estufa (DK- 83) a una temperatura constante de 75 °C durante 72 horas hasta peso constante. Una vez secas, las muestras se maceraron en morteros de porcelana, y luego fue tomada una muestra de 0.20 g para proceder según las respectivas metodologías.

Los cationes y el fósforo fueron extraídos con una mezcla de ácidos (H₂SO₄; HNO₃; HClO₄) en proporción 1:10:4 (v/v) respectivamente. Las concentraciones de Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺ y Na⁺ en el extracto se determinaron por fotometría de absorción en un espectrofotómetro de absorción atómica SHIMATSU AA-660. El contenido de fósforo se determinó por el método de espectroscopía de absorción molecular (colorimetría) a una longitud de onda de 660 nm. El color fue desarrollado mediante la adición de azul molibdeno. El destino de las sales (Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺ y Na⁺) en los diferentes órganos fue



Figura 1 - A la izquierda imagen representativa de la distribución de las plantas en las bandejas empleadas en el experimento en condiciones de hidroponía. A la derecha imagen mostrando la diferencia en el crecimiento de la variedad en condiciones de salinidad (88 mM de NaCl) y sin salinidad.

confirmado usando microscopio electrónico, desarrollando barrido y microanálisis. Se determinaron las relaciones iónicas de los cationes en relación al Na^+ , mediante el cociente de su concentración.

Técnicas de Fijación y Microanálisis

Las diferentes muestras de raíces, vainas y hojas fueron fraccionadas en tres partes, parte inferior, media y superior, y luego debidamente identificadas y recubiertas con una fina malla de cobre para su estudio, empleando glutaraldehído al 2% para la formación de puentes en los tejidos hasta conseguir la fijación rápida. Se realizó una “congelación rápida” con nitrógeno líquido para la preservación de las características moleculares y la composición química estable en los tejidos. Posteriormente se llevaron al microscopio electrónico para cuantificar y observar los iones, fundamentalmente el destino y acumulación de sodio en cada órgano realizando observaciones en 3D, 10nm y un aumento hasta de 20,000x.

Análisis estadísticos.

Se calculó la media y la desviación estándar del contenido de todos los cationes y aniones determinados en ambas condiciones (tratamiento salino y tratamiento control) y se establecieron las diferencias mediante la prueba de *t* de Student para niveles de significación de 5% y 1%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de crecer la variedad Cuba-C-204 en condiciones de hidroponía con dos niveles de salinidad [solución salinizada a base de NaCl (88 mM) una CE de 8 dS.m^{-1} y sin NaCl con CE de 0.36 dS.m^{-1}], contactase el daño aparente y la reducción del crecimiento que sufre la variedad en condiciones de salinidad (Figura 1) y junto con esto observase una variación en el contenido catiónico de la raíz, la vaina y las hojas dependiente del tratamiento aplicado (Tabla 1).

Contenido catiónico en diferentes órganos

Al evaluar el contenido catiónico en los diferentes órganos de la planta evaluados, podemos apreciar que el contenido de Na^+ en los órganos presentó diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos en la variedad estudiada y su incremento vario, siendo mayor el contenido en la raíz > vainas > hojas, demostrando la capacidad de inclusión de esta variedad

para mantener un potencial hídrico radicular más bajo que permite la absorción de agua y la continuidad del crecimiento como estrategia de adaptación al estrés aplicado (Tabla 1).

A nivel foliar, si consideramos las vainas y las hojas, el contenido de Na^+ disminuyó respecto al radicular pero su concentración fue siempre superior en el tratamiento salinizado, demostrándose con ello que existió inclusión de Na^+ . Según Munns et al. (2012), esta disminución tiene lugar por la selectividad de las membranas de las células de las raíces (las membranas de las células periféricas de la banda de Gasparay) para evitar la toxicidad iónica en las hojas una vez que se produce el cambio de locación apoplástica a simplástica.

Algunos resultados en trigo han demostrado que la mayoría de las variedades hexaploides (trigos harineros) incluyen significativamente Na^+ cuando se establecen en un medio salino, siendo los valores máximos de tolerancia $90 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{ms}$ sin que ocurra la toxicidad iónica (Byrt et al., 2014), y variando esta respuesta en relación a la existencia de variabilidad genética para este carácter (Munns & Gilliham, 2015).

Tanto en las raíces como en las vainas el contenido de potasio y de magnesio disminuyó significativamente en el tratamiento salino respecto al control (Tabla 1), aunque en raíces se acumuló la mayor cantidad de potasio, mientras que valores del indicador en las vainas y las hojas fueron similares. Este resultado denota que, aunque existió interferencia nutricional Na^+/K^+ , existió acumulación activa del potasio, quizás por su importancia en la actividad enzimática fundamentalmente y por la actividad en la osmorregulación (Hamamoto et al., 2015). Algunos estudios demuestran que en condiciones de salinidad ocurre una disminución de los valores de potasio por la escasa selectividad del antitransportador Na^+/K^+ cuando la concentración de sodio es considerablemente alta. En estos casos ocurre la interferencia nutricional, llamado efecto nutricional y cuando el antitransportador Na^+/K^+ se desestabiliza totalmente, ocurre la toxicidad iónica y el daño celular (Munns et al., 2012).

El contenido de calcio se incrementó significativamente en los tres órganos evaluados en el medio salino y se produjo un incremento desde la raíz hasta la hoja (Tabla 1). El papel del ión Ca^{2+} en la respuesta de las plantas a salinidad resulta esencial,

Tabla 1 - Contenido catiónico y relación iónica en raíces, vainas y hojas de plantas de la variedad de trigo Cuba-C-204 sometidas a estrés salino

Órgano	Contenido catiónico(μmol.g ⁻¹ ms)									
	Na ⁺		K ⁺		Ca ²⁺		Mg ²⁺		P ²⁺	
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
Raíces	9,66	103,01**	258,62	101,01**	5,95	8,42**	26,66	16,74**	52,84	88,87**
Vainas	5,67	67,21 **	116,43	80,74**	7,11	10,51**	16,66	25,73**	42,32	38,23*
Hojas	1,12	3,32 **	123,14	81,11**	5,23	22,21**	79,14	75,60*	53,60	38,14**

* y ** Representa diferencias significativas para el 5% y 1% el respectivamente por la prueba de t-Student; C y S, representan tratamiento control y salino, respectivamente.

por su papel señalizador y estabilizador de membranas y su efecto sobre la actividad de algunos transportadores iónicos (Uehlein et al., 2009). La presencia de Ca²⁺ puede reducir la magnitud del efecto negativo de la salinidad en el crecimiento, fenómeno que se ha atribuido al efecto estabilizador de la membrana y al mantenimiento de su capacidad selectiva. En la actualidad se sabe que el papel del Ca²⁺ es complejo, ya que actúa como intermediario en la cascada de señales que conducen a la transcripción de numerosos genes involucrados en la respuesta adaptativa a la salinidad (Munns et al., 2006).

Por su vez el contenido de magnesio disminuyó significativamente en las raíces (Tabla 1), y fue mayor en las hojas, aspecto que esta correlacionado con el contenido de clorofila, por ser éste su ion central en este proceso (James et al., 2011).

He esperado que las afectaciones en la inclusión de Na⁺ provoquen alteraciones en el aparato fotosintético por el papel que juega en la conformación de la clorofila (Kiani-Poulla & Rasouli, 2014), dependiendo esta respuesta del grado de tolerancia de la variedad, por ello la identificación y evaluación de variedades tiene gran importancia para encontrar posibles progenitores con alta respuesta productiva en condiciones salinas (Munns et al., 2012).

El contenido de fósforo en las raíces fue superior en el medio salino, mientras que en las vainas y hojas su concentración disminuyó respecto al tratamiento control y al contenido en raíces en el medio salino (Tabla 1). Otros trabajos han identificado este mismo resultado en condiciones de salinidad donde el contenido de fósforo en las raíces se incrementa significativamente debido al consumo del ATP quedando una cantidad considerable de fósforo inorgánico. Su consumo energético es fundamentalmente causado por la actividad

de las ATPasas de las membranas de las células periféricas de la banda de Gasparay mientras que en la parte foliar la síntesis de ATP es más alta y la presencia de fósforo inorgánico es menor (Iqbal & Ashraf, 2013).

Distintos ejemplos permiten comprobar que la expresión de genes relacionados con la homeostasis iónica, a través de la actividad o la regulación de los sistemas de transporte, aumentan la tolerancia al estrés salino (Munns et al., 2012; Nguyen et al., 2013). La tolerancia de un cultivo a la salinidad, basado en la inclusión de iones es un carácter complejo y de difícil mejora debido al elevado pleiotropismo de los genes involucrados en la tolerancia. Generalmente los mejoradores adoptan posiciones que apuntan a la evaluación de la tolerancia asociada al crecimiento, acumulación de materia seca y mayor rendimiento agrícola, en condiciones de alta concentración de sales en el suelo (función de la variabilidad natural de la salinidad) o en condiciones de hidroponía (donde la variación del contenido de sales es controlada) (Munns & Gilliam, 2015). Unido a esto, la inclusión y exclusión de iones son considerados indicadores muy precisos, porque dan la medida de la capacidad de ajuste osmótico y por consiguiente de adaptación a la salinidad en los suelos (Hongbo et al, 2006), de ahí la importancia de su determinación y de los posibles sitios de acumulación en las variedades para su recomendación como posibles parentales en los programas de mejora genética.

La entrada de K⁺ y Na⁺ en la célula se produce por la acción de transportadores y canales iónicos del plasmalema. Por su parte la extrusión del Na⁺ puede ocurrir como medida para evitar el daño celular. Otro mecanismo importante para conseguir la reducción del Na⁺ citosólico es la expulsión al medio extracelular. La extrusión de Na⁺ en la mayoría en plantas superiores



está mediada por antiportadores Na^+/H^+ del plasmalema (Byrt et al., 2014), de ahí que resulta extremadamente importante entonces saber la localización de estos iones dentro de la planta, ya sea en el apoplasto o en el simplasto.

Contenido catiónico en diferentes secciones de órganos

Al seccionar la raíz (parte inferior, media y próxima al tallo) para determinar los sitios de localización de Na^+ en plantas sometidas a estrés salino se observó que en la parte inferior donde se produjo la mayor acumulación (Figura 2a). Sin embargo, se observó disminución del contenido de Ca^{2+} en esta parte, respecto a la parte media (lugar donde se encontró mayor concentración). Quizás en esta región (banda de *Casparay*) el Ca^{2+} fue transportado rápidamente hacia la parte foliar para jugar su papel estabilizador de membranas. Como elemento significativo se destaca que siempre el contenido de fósforo fue alto en este órgano, con poca diferencia entre las distintas partes seccionadas y una tendencia a aumentar da parte inferior hasta las proximidades del tallo (Figura 2a).

Una de las características diferenciales entre especies tolerantes o sensibles al estrés salino ya descritas es la capacidad de transportar los iones Na^+ desde la raíz a la parte aérea y la retranslocación inversa posterior (este elemento poco explicado aún) (James et al., 2011). Otros trabajos han señalado diferencias en la actividad de ATPasas de plasmalema y tonoplasto en las raíces de cultivos tolerantes y sensibles de cebada (*Hordeum vulgare* L.) y arroz (*Oryza sativa* L.); posiblemente relacionadas a las diferencias en la compartimentación radical del Na^+ y su retranslocación desde la parte aérea (Karimi et al., 2005). Los cambios inducidos por el estrés salino en la ultra estructura, morfología y desarrollo de

tejidos especializados (endodermis y exodermis) de la raíz reflejan los cambios adaptativos conducentes al control de la absorción y transporte de agua e iones a la parte aérea, así como su acumulación (Kasukabe et al., 2004), aspecto que es importante estudiar al detalle.

En la vaina se acumuló la mayor cantidad de sodio del total encontrado en el área foliar (Tabla 1) y su mayor localización fue inmediatamente después de la base del tallo (parte basal de la vaina, denominada como parte inferior) (Figura 2b). De igual modo se encontró un alto contenido de fósforo en las partes basal y media de este órgano. La mayor interferencia nutricional del sodio se observó en el catión potásico, con una relación iónica media de 0.45. En las partes media y más próxima a la lígula se elevó la concentración de calcio, siendo este el catión mayoritario en la parte próxima a la lígula con una relación iónica de 2.66. Al mismo tiempo se encontró el mayor contenido de magnesio en esta parte de la vaina (Figura 2b). En las hojas se observó mayor homogeneidad de concentraciones en los tres fragmentos (Figura 2c), con la particularidad de que en la parte media no se encontró presencia de sodio. Además, la concentración de Mg^{2+} fue similar en los tres fragmentos y su relación con la concentración de Na^+ fue de 2.77 en media (dados no mostrados).

Al realizar el microanálisis a los tres fragmentos de la hoja para buscar más detalladamente la localización del Na^+ se confirmó la ausencia total de sodio en la parte media de la hoja y una mayor diversidad iónica, observándose C, O, Zn y S (Figura 3). Quizás el sodio tenga un efecto nutricional marcado sobre estos elementos. Algunos estudios han demostrado que la

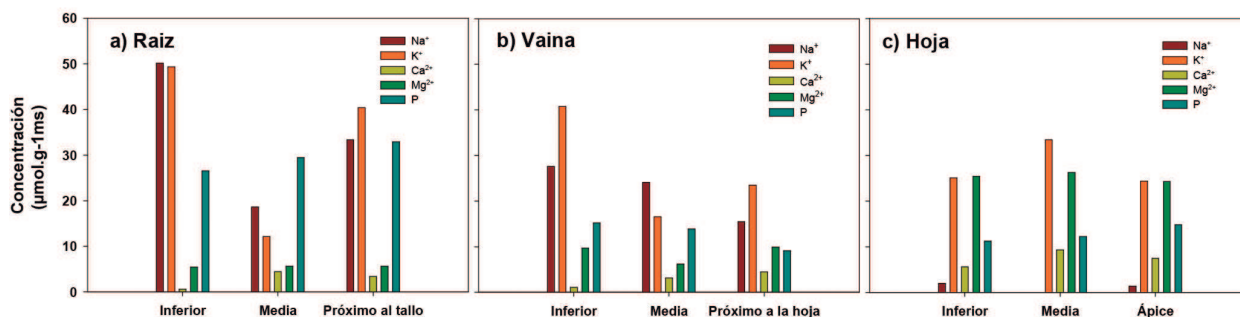


Figura 2 - Determinación de sitios de acumulación de cationes realizado en diferentes secciones de tres órganos [raíz (a), vaina (b) y hoja (c)] de la variedad de trigo Cuba-C-204 crecida en condiciones de estrés salino con 88 mM de NaCl.

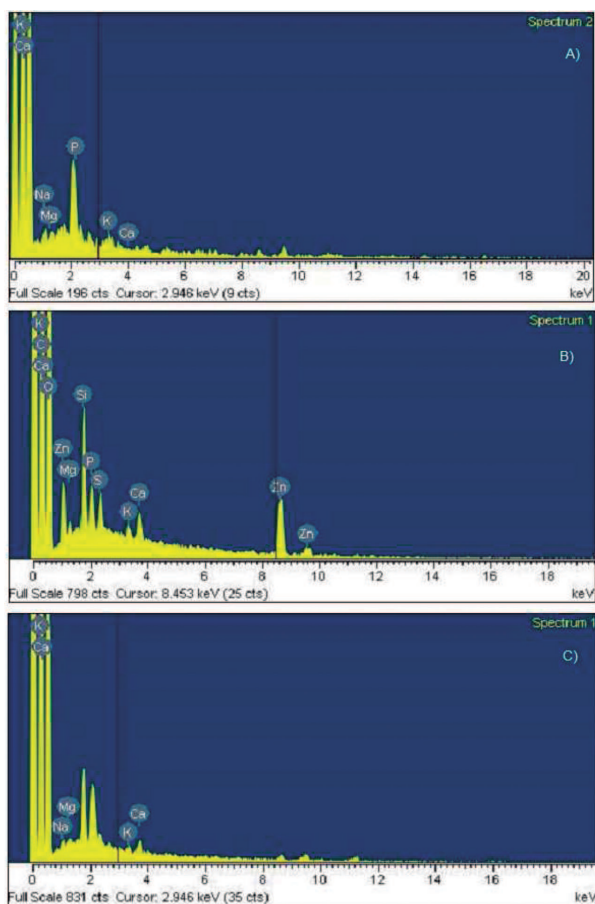


Figura 3 - Determinación de cationes por microanálisis realizado en la parte más inferior de parte basal de la hoja (a), parte media (b) y parte próxima al ápice de la hoja (c) de la variedad de trigo Cuba-C-204 en un medio salino con 88 mM de NaCl

interferencia nutricional (efecto nutricional de la salinidad) es atribuido mayormente al contenido de sodio (Munns et al., 2012).

Fundamentalmente en la parte media de la hoja (Figura 3b), donde generalmente la actividad bioquímica es más alta, se encontró la mayor cantidad de potasio y calcio. La presencia mayoritaria de estos dos cationes verifica su empleo en el ajuste osmótico y en general para la homeostasis celular (Munns et al., 2012). En este fragmento de la hoja se observó además un alto porcentaje de carbono (Figura 3b), aspecto que denota la eficiencia de la actividad fijadora de la enzima RubisCO en esta variedad aún en condiciones de salinidad elevada (Argente et al., 2014).

En las partes basal y apical de la hoja se observó sodio en las vacuolas, incluso se pudo fijar el catión mediante técnicas de fijación (en la base de la hoja) como es mostrado en la Figura 4.

La técnicas de microanálisis y fijación empleadas contribuyeron a verificar que de los 3.32 $\mu\text{molg}^{-1}\text{ms}$ de sodio acumulados en la hoja de la variedad de trigo Cuba-C-204, obtenido por espectrofotometría de absorción atómica se distribuyó en la parte basal y apical y que la parte de mayor actividad metabólica no se acumuló Na⁺ en el tejido parenquimático en general. Este resultado obtenido puede contribuir a esclarecer estudios sobre la inclusión y la extrucción iónica durante la adaptación de las plantas a la salinidad, el mantenimiento de la actividad bioquímica en condiciones de estrés salino (Deák et al., 2011) y para evitar el daño celular causado por cationes como el Na⁺.

En ocasiones el flujo de agua provocado por la transpiración produce el movimiento de sales que pueden resultar tóxicas como el Na⁺ desde las raíces hasta las hojas en múltiples especies y las plantas consiguen disminuir su potencial osmótico y en consecuencia el hídrico mediante la acumulación activa de cationes, pero cuando la selectividad iónica disminuye puede propiciar la toxicidad iónica (Hauser & Horie, 2010). En las raíces, los solutos que entran siguiendo el flujo transpiratorio, se mueven por el apoplasto, y atraviesan la membrana de una célula radical, continúan su transporte por el simplasto hasta alcanzar el xilema (Hamamoto et al., 2015). En teoría, el movimiento de

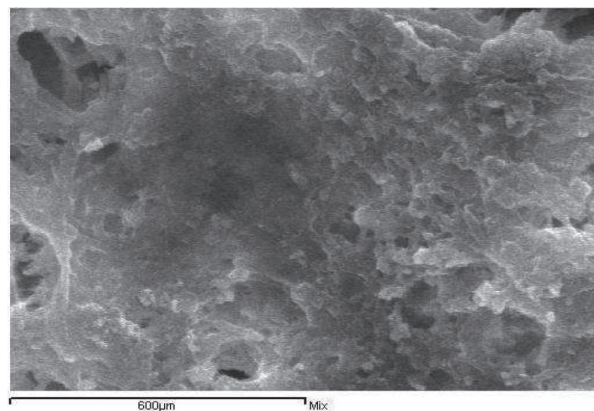


Figura 4 - Fijación del Na⁺ en el microscopio electrónico. Los puntos rojos denotan lugares donde se observó el sodio en la vacuola (determinación realizada a 600 μm)

iones por el apoplasto se interrumpe en la endodermis: la impermeabilidad de las paredes de las células endodérmicas engrosadas con suberina y lignina (banda de *Caspar*) impiden el libre flujo (Jacoby et al., 2011). En este punto, los iones deberían atravesar la barrera selectiva de las membranas hasta los vasos del xilema. Sin embargo, en algunas especies como arroz, existen sitios de paso donde los iones pueden saltarse la barrera selectiva de membranas y continuar en el flujo transpiratorio por vía apoplástica incluso hasta las células oclusivas (Kasukabe et al., 2004) y allí pueden propiciar el daño celular, dependiendo del grado de tolerancia de la especie y/o variedad. En todo este camino hasta llegar a la hoja, durante el flujo de iones, éstos encuentran células especializadas con un sistema vacuolar desarrollado. Tal es el caso del trigo que hemos evaluado, la variedad Cuba-C-204, donde los sistemas de transporte a través de membranas plasmática o vacuolar descritos previamente pueden contribuir a la selectividad en el transporte de iones a las hojas lo que refuerza los resultados que se han obtenido aquí.

Actualmente se sostiene que el carácter poligénico de la tolerancia al estrés salino ha sido el principal obstáculo para la mejora genética (Hauser & Horie, 2010; ArgenteL et al., 2013). Por métodos de mejora genética tradicional, como selección y cruzamientos, se han conseguido variedades o líneas más productivas para condiciones de salinidad en cultivos como alfalfa (Cornacchione & Suarez, 2015), sorgo (Munns & Gilliam, 2015) y trigo (Byrt et al., 2014), pero entre los efectos de la salinidad en la fisiología de las plantas lo más difícil de esclarecer ha sido la toxicidad iónica dado que las plantas incluyen sales que pueden propiciar daños irreparables en los tejidos y afectar su productividad en general (Ramezani et al., 2013). El proceso de la mejora genética para este carácter ha tenido éxito dependiendo de la variabilidad genética y la heredabilidad para el carácter de tolerancia del cultivo (Tuberosa et al., 2011) de ahí la importancia de estudiar al detalle el proceso de inclusión y los sitios de acumulación de las sales en variedades que muestran tolerancia para este carácter. Tales estudios permitirán la recomendación como posible parental para implementar programas de mejora genética y además su recomendación para ser establecidas en ecosistemas frágiles y degradados donde otras especies no muestran un buen potencial genético productivo por existir en los suelos conductividades eléctricas elevadas producto al alto contenido de Na^+ .

En conclusión, esta es la primera vez que este tipo de estudio es realizado a una variedad cubana a este nivel de detalle. Para las condiciones de salinidad estudiadas, la variedad mostro interferencia nutricional del catión Na^+ en el P^{2+} , así como, alta variabilidad de la inclusión de Na^+ en los tres órganos vegetales con mayor inclusión en las raíces > vainas > hojas, siendo la parte media de la hoja el único local donde dejó de acumularse Na^+ . Las técnicas empleadas se mostraran adecuadas y permitieron verificar los sitios de retención y acumulación de catión y en especial Na^+ . La información obtenida permite confirmar la variedad Cuba-C-204 como genotipo capaz de generar nuevas variedades con la capacidad de incluir Na^+ y promover tolerancia a salinidad.

4. LITERATURA CITADA

ARGENTEL, L.; GONZÁLEZ, L. M.; AGUILAR, R. L.; FONSECA, I. Efectos de la salinidad en las variables hídricas potenciales hídrico y osmótico y ajuste osmótico en cultivares cubanos de trigo (*Triticum aestivum* L. y *T. durum* L.). **Cultivos Tropicales**, v.34, n.4, p.43-48, 2013.

ARGENTEL, L.; GONZÁLEZ, L. M.; LÓPEZ, R.; FONSECA, I.; GIRÓN, R. Efecto de la salinidad sobre la fenología, los componentes del rendimiento y su relación con la tolerancia varietal (*Triticum aestivum* L. y *T. durum* L.). **Cultivos Tropicales**, v.29, n.3, p.53-57, 2008.

ARGENTEL, L.; LÓPEZ, R. D.; GONZÁLEZ, L. M.; ORTEGA, E.; RODÉS, R.; FERNÁNDEZ, Y. Actividad de la enzima ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa en variedades de trigo en condiciones de salinidad. **Centro Agrícola**, v.41, n.3, p.85-91, 2014.

BENDERRADJI, L.; BRINI, F.; AMAR, S. B.; KELLOU, K.; AZAZA, J.; MASMOUDI, K.; BOUZERZOUR, H.; HANIN, M. Sodium transport in the seedlings of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes showing contrasting salt stress tolerance. **Australian Journal of Crop Science**, v.5, n.3, p.233–241, 2011.

BYRT, C. S.; XU, B.; KRISHNAN, M.; LIGHTFOOT, D. J.; ATHMAN, A.; JACOBS, A. K.; WATSON-HAIGH, N. S.; PLETT, D.; MUNNS, R.; TESTER, M.; GILLIAM, M. The Na^+ transporter, TaHKT1; 5 D, limits shoot Na^+ accumulation in bread wheat. **The Plant Journal**, v. 80, n.3, p.516-526, 2014.

- CORNACCHIONE, M. V.; SUAREZ, D. L. Emergence, forage production, and ion relations of alfalfa in response to saline waters. **Crop Science**, v.55, n.1, p.444-457, 2015.
- DEÁK, C.; JÄGER, K.; FÁBIÁN, A.; NAGY, V.; ALBERT, Z.; MISKÓ, A.; BARNABÁS, B.; PAPP, I. Investigation of physiological responses and leaf morphological traits of wheat genotypes with contrasting drought stress tolerance. **Acta Biologica Szegediensis**, v.55, n.1, p.69–71, 2011.
- HAMAMOTO, S.; HORIE, T.; HAUSER, F.; DEINLEIN, U.; SCHROEDER, J. I.; UOZUMI, N. HKT transporters mediate salt stress resistance in plants: from structure and function to the field. **Current opinion in biotechnology**, v.32, p.113-120, 2015.
- HAUSER, F.; HORIE, T. A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K⁺/Na⁺ ratio in leaves during salinity stress. **Plant Cell Environment**, v.33, n.4, p.552-565, 2010.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture for growing plants without soil. California: **California Agricultural Experiment Station**, Circ. 347, 1950, 32p.
- HONGBO, S.; ZONGSUO, L.; MINGN, S. Osmotic regulation of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at soil water deficits. **Colloids and Surf. Biointerfaces**, v.47, n.2, p.132-139, 2006.
- IQBAL, M.; ASHRAF, M. Gibberellic acid mediated induction of salt tolerance in wheat plants: growth, ionic partitioning, photosynthesis, yield and hormonal homeostasis. **Environmental and Experimental Botany**, v.86, p.76-85, 2013.
- JACOBY, R. P.; TAYLOR, N. L.; MILLAR, A. H. The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance. *Trends in plant science*, v.16, n.11, p.614-623, 2011.
- JAMES, R. A.; BLAKE, C.; BYRT, C. S.; MUNNS, R. Major genes for Na⁺ exclusion, Nax1 and Nax2 (wheat HKT1; 4 and HKT1; 5), decrease Na⁺ accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. **Journal of experimental botany**, v.62, n.8, p.2939-2947, 2011.
- KARIMI, G.; GHORBANLI, M.; HEIDARI, H.; KHAVARI NEJAD, R. A.; ASSAREH, M. H. The effects of NaCl on growth, water relations, osmolytes and ion content in *Kochia prostrata*. **Biologia Plantarum**, v.49, n.2, p.301-304, 2005.
- KASUKABE, Y.; HE, L.; NADA, K.; MISAWA, S.; IHARA, I.; TACHIBANA, S. Overexpression of Spermidine Synthase Enhances Tolerance to Multiple Environmental Stresses and Up-Regulates the Expression of Various Stress-Regulated Genes in Transgenic Arabidopsis thaliana. **Plant Cell Physiol**, v.45, p.712-722, 2004.
- KIANI-POULLA, A.; RASOULI, F. The potential of leaf chlorophyll content to screen bread-wheat genotypes in saline condition. **Photosintetic**, v.52, n.2, p.288-300, 2014.
- MUNNS, R.; GILLIHAM, M. Salinity tolerance of crops – what is the cost?. **New Phytol**, v.208, n.3, p.668-673, 2015.
- MUNNS, R.; JAMES, R. A.; LÄUCHLI, A. Approaches to increasing salt tolerance of wheat and other cereals. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.5, p.1025-1043, 2006.
- MUNNS, R.; JAMES, R. A.; XU, B.; ATHMAN, A.; CONN, S. J.; JORDANS, C.; GILLIHAM, M. Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. **Nature biotechnology**, v.30, n.4, p.360-364, 2012.
- NGUYEN, V. L.; RIBOT, S. A.; DOLSTRA, O.; NIKS, R. E.; VISSER, R. G.; VAN DER LINDEN, C. G. Identification of quantitative trait loci for ion homeostasis and salt tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Molecular Breeding**, v.31, n.1, p.137-152, 2013.
- RAMEZANI, A.; NIAZI, A.; ABOLIMOGHADAM, A. A.; BABGOHARI, M. Z.; DEIHIMI, T.; EBRAHIMI, M.; EBRAHIMIE, E. Quantitative expression analysis of TaSOS1 and TaSOS4 genes in cultivated and wild wheat plants under salt stress. **Molecular biotechnology**, v.53, n.2, p.189-197, 2013.



SHI, G. L.; ZHU, S.; MENG, J. R.; QIAN, M.; YANG, N.; LOU, L. Q.; CAI, Q. S. Variation in arsenic accumulation and translocation among wheat cultivars: The relationship between arsenic accumulation, efflux by wheat roots and arsenate tolerance of wheat seedlings. **Journal of hazardous materials**, v.30, n.289, p.190-196, 2015.

TUBEROSA, R.; MACCAFERRI, M.; COLALONGO, C. Molecular Breeding for a Changing Climate: Bridging Ecophysiology. In: Crop stress management and global climate change, CABI **Climate Change Series**, v.2, p.122-171, 2011.

UEHLEIN N.; LOVISOLO C.; SIEFRITZ F.; KALDENHOFF R. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. **Nature**, v.425, p.734-737, 2009.

Recebido para publicação em 01/03/2016 e aprovado em 11/06/2016.