

Evolución de metabolitos primarios y pigmentos fotosintéticos durante la ontogenia de cotiledones de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) sometidos a estrés salino

Ruffino, Ana M. C.¹; Mariana Rosa¹; Mirna Hilal¹; Juan A. González² y Fernando E. Prado¹

¹ Cátedra de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias Naturales e IML. Miguel Lillo 205, (4000) Tucumán, Argentina. E-mail: ruffinoana@hotmail.com

² Instituto de Ecología, Área Botánica. Fundación Miguel Lillo. Miguel Lillo 251, (4000) Tucumán, Argentina.

RESUMEN — Ruffino, Ana M. C.; Mariana Rosa; Mirna Hilal; Juan A. González y Fernando E. Prado. 2008. "Evolución de metabolitos primarios y pigmentos fotosintéticos durante la ontogenia de cotiledones de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) sometidos a estrés salino". *Lilloa* 45 (1-2). Se estudió la variación en el desarrollo (PF y PS) y en el contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides), carbohidratos solubles (sacarosa, glucosa y fructosa), lípidos (fosfolípidos, glicolípidos y esteroides), proteínas solubles y prolina durante el ciclo ontogénico de cotiledones de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) sometidos a salinidad. Los resultados obtenidos mostraron que la presencia de sal (230 mM) afecta tanto la distribución como el contenido de la mayoría de los compuestos analizados. Los niveles de pigmentos fotosintéticos, lípidos y proteínas solubles resultaron significativamente inferiores en los cotiledones estresados; mientras que, los carbohidratos solubles (glucosa y sacarosa) mostraron contenidos más altos. La prolina libre, por su parte, prácticamente no exhibió cambios de significación entre los cotiledones control y estresados hasta el 12^{avo} día de desarrollo, para luego mostrar un fuerte incremento, superior al 600%, en los cotiledones control, y en mucha menor proporción (+170%) en los estresados. La relación fosfolípidos/glicolípidos si bien, no mostró variaciones de significación a lo largo de todo el ciclo para cada tratamiento, los valores resultaron inferiores en los cotiledones estresados. En función de los resultados alcanzados se discute el efecto del estrés salino sobre la ontogenia cotiledonar.

PALABRAS CLAVE: Cotiledones, metabolitos, ontogenia, quinoa, salinidad.

ABSTRACT — Ruffino, Ana M. C.; Mariana Rosa; Mirna Hilal; Juan A. González and Fernando E. Prado. 2008. "Evolution of primary metabolites and photosynthetic pigments during ontogeny of cotyledons of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) under salt stress". *Lilloa* 45 (1-2). Development variation (FW and DW) and photosynthetic pigments (chlorophyll and carotenoids), soluble carbohydrates (sucrose, glucose and fructose), lipids (phospholipids, glycolipids and sterols), soluble proteins and proline content variations were studied during ontogenetic cycle of quinoa cotyledons (*Chenopodium quinoa* Willd.) under salinity condition. Results showed that presence of salt (230 mM) affects the distribution as well as the content of most the analyzed compounds. Photosynthetic pigments, lipids and soluble proteins were significantly lower in stressed cotyledons; while, soluble carbohydrates (glucose and sucrose) contents were higher than in control cotyledons. On the other hand, free proline content didn't exhibit significant changes between control and stressed cotyledons during the first twelve days, and then it showed a strong increment, bigger to 600%, in control cotyledons, and in a smaller proportion (+170%) in stressed cotyledons. Although phospholipids/glycolipids ratio didn't show significant variations along the ontogenetic cycle in both treatments, the lowest values were observed in stressed cotyledons. On the basis of these results we discussed the effects of saline stress on cotyledonar ontogeny.

KEYWORDS: Cotyledons, metabolites, ontogeny, quinoa, salinity.

INTRODUCCIÓN

La quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) es una dicotiledónea anual nativa de la Región Andina de América del Sur (Risi & Galwey, 1984). Su grano rico en almidón hace que la misma sea considerada como un pseudocereal, por cuanto los verdaderos cereales son monocotiledóneas. Además de su riqueza amilácea el grano de quinoa posee un elevado contenido proteico rico en aminoácidos esenciales, lo que lo convierten en un alimento altamente nutritivo (Jacobsen, 1993).

La quinoa al igual que otros miembros de la familia *Chenopodiaceae* se caracteriza por presentar una extraordinaria tolerancia a la salinidad, sequía, bajas temperaturas y suelos pobres en nutrientes, situaciones que se dan con bastante frecuencia en las regiones áridas y semiáridas donde prospera (Reimann & Breckle, 1993; Ungar, 1996; Prado, *et al.*, 2000). La elevada tasa de crecimiento que exhibe la quinoa en las empobrecidas regiones donde se la cultiva habitualmente, puede ser atribuida a su eficacia fotosintética por cuanto sin ser una verdadera planta C₄, exhibe valores de fotorespiración inferiores a los de las especies C₃ (Gandarillas, 1983). Por otra parte, la gran resistencia que exhibe frente a la salinidad determina que sea considerada como una especie halófito (Jacobsen *et al.*, 1994).

La adaptación de las plantas halófitas a la salinidad está asociada, entre otras cosas, a ajustes metabólicos que conducen a la acumulación de determinados compuestos tales como: azúcares solubles, polioles, aminoácidos, glicina betaína y aminos cuaternarias, entre otros (Flowers *et al.*, 1977; Gorham *et al.*, 1981; Briens & Larher, 1982; Bohnert *et al.*, 1995). Estas sustancias además de desempeñar un rol importante en la regulación osmótica de las células, actúan como estabilizadores y protectores de ciertos componentes celulares, razón por la cual se los conoce también con el nombre de osmolitos compatibles o protectores (Turner, 1990; Bohnert *et al.*, 1995).

El grado de resistencia de las plantas a condiciones de salinidad elevada conlleva

aparejada a la síntesis de osmolitos, toda una serie de cambios metabólicos y morfológicos que, en mayor o menor medida, van a afectar su desarrollo y crecimiento (Munns, 1993). Entre los cambios más notables que se observan en las plantas sometidas a estrés salino, merecen mencionarse aquellos que afectan la capacidad fotosintética y el metabolismo primario, especialmente el referido a los hidratos de carbono, lípidos y proteínas (Bolarín *et al.*, 1995; Prado *et al.*, 1995, 2000; Pérez-Alfocea & Larher, 1995). La sensibilidad de las plantas a la salinidad, además de depender de sus ajustes metabólicos, varía con el estado de desarrollo de las mismas (Adam, 1990); siendo, por lo general, más sensibles en los primeros estadios (Ungar, 1991).

En la mayoría de las especies los cotiledones u hojas embrionales desempeñan un papel importante durante la germinación y primeros estadios de desarrollo de la plántula (Bewley & Black, 1994). Así, mientras en algunas especies los cotiledones adquieren una gran significación desde el propio momento de la germinación, debido a su capacidad de acumular sustancias de reserva; en otras, al no tener dicha propiedad, su papel adquiere relevancia luego de producido el establecimiento de la plántula. En estos casos la energía necesaria para la germinación proviene de las reservas acumuladas en otras partes de la semilla, tal como ocurre con la quinoa cuyas sustancias de reserva se acumulan en el perisperma (Burnouf-Radosevich, 1988). En esta clase de plantas los cotiledones adquieren un rol de significación cuando tiene lugar la síntesis de clorofila y el inicio del proceso fotosintético. Dentro de ese contexto y considerando la poca información existente con relación al efecto del estrés salino a lo largo del ciclo vegetativo de las plantas, se plantea como objetivo de este trabajo analizar el efecto de la salinidad sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos, hidratos de carbono, proteínas, lípidos y prolina durante el ciclo ontogénico de los cotiledones de quinoa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de cultivo.— Se utilizaron semillas de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) adquiridas en el Mercado Municipal de Salta, Argentina. La germinación se realizó en bandejas plásticas de 10x15x3 cm sobre un soporte de vermiculita. Las bandejas fueron regadas cada 3 días con 100 ml de solución de Hoagland (dilución 1:8) para las plantas control y con la misma solución adicionada de NaCl 230 mM para las plantas sometidas a estrés salino. A fin de evitar una excesiva concentración de sal como consecuencia de la evapotranspiración se intercalaron periódicamente riegos con agua destilada libre de NaCl. El desarrollo de las plántulas se realizó con un fotoperíodo de 12 h luz/oscuridad y una temperatura de 25/20 ± 1°C (día/noche). La densidad de flujo fotónico a nivel de las plántulas fue de 90 $\mu\text{moles m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y la humedad relativa se mantuvo entre 70-80%. Una vez completados los tiempos de crecimiento estipulados (6, 12 y 21 días), se procedió a la recolección de los cotiledones para la realización de los correspondientes estudios. Esta arbitraria distribución de las fechas de muestreo se hizo en función del contenido de clorofila, como una medida del estado de desarrollo de los cotiledones, y en lo establecido como duración del ciclo ontogénico para hojas completamente desarrolladas de otras especies (Patakas & Noitsakis, 2000). Asimismo, la última fecha de recolección corresponde al estadio en el cual, si bien, los cotiledones aún resultan funcionales a la plántula ya se encuentran en estado senescente; mientras las primeras hojas verdaderas, perfectamente desarrolladas, y con un tamaño similar al de los propios cotiledones ya son fotosintéticamente funcionales (González, JA. Comunicación personal, 2005). El material destinado a los análisis químicos se conservó a -20°C hasta su utilización. El peso seco (PS), previa determinación del peso fresco (PF), se obtuvo por secado de los cotiledones a 70 °C durante 72 h.

Extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos.— La extracción de los pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides) se realizó en oscuridad a 45°C durante 12 h utilizando 25 mg de cotiledones y 2 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), de acuerdo a la técnica de Chapelle & Kim (1992). La cuantificación de los mismos se hizo a partir de las lecturas de absorbancia a 664, 648 y 472 nm siguiendo el procedimiento de Wellburn (1994).

Extracción y cuantificación de carbohidratos solubles y prolina.— Los carbohidratos solubles y prolina se extrajeron tratando el material (0,5 g) con 4 ml de etanol al 80% a 75 °C según el método descrito por Prado *et al.* (2000). La cuantificación de los azúcares solubles totales se realizó con el método del fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), la fructosa por la técnica del resorcinol-tiourea (Roe & Papadopoulos, 1954), la sacarosa por el mismo método de acuerdo a la modificación de Cardini *et al.* (1955); en tanto que para la glucosa se utilizó la reacción acoplada de la glucosa oxidasa-peroxidasa (Jorgensen & Andersen, 1973). La prolina fue estimada siguiendo la técnica Ting & Rousef (1979).

Extracción y cuantificación de lípidos.— La extracción de los lípidos se realizó homogeneizando 1 g de cotiledones con 4 ml de metanol según la técnica de Zenoff *et al.* (1994). Para la cuantificación de los fosfolípidos (ímoles de Pi) se siguió la técnica de Ames (1966), para los glicolípidos (ímoles de glucosa) la del fenol-ácido sulfúrico (Roughan & Batt, 1967); mientras que para los esteroides (ímoles de estigmasterol) se utilizó el método de Lynch *et al.* (1963).

Otros análisis.— Las proteínas solubles se extrajeron con buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4 conteniendo b-mercaptoetanol 1 mM y MnSO₄ 5 mM. El contenido proteico se determinó por el método de Lowry *et al.* (1951).

Estadística.— Los datos presentados fueron analizados por el test de Student ($P \leq 0,05$) y corresponden al valor promedio \pm DS de 4 experimentos diferentes.

RESULTADOS

Peso fresco (PF) y peso seco (PS).— El PF de los cotiledones tanto en presencia de sal como en el control mostró una clara tendencia a aumentar a lo largo del ciclo ontogénico; sin embargo, dicha tendencia resultó mucho más marcada en los cotiledones estresados. Al analizar el PS se observó que, mientras las plántulas control no mostraban variaciones significativas a lo largo del ensayo, los cotiledones provenientes de las plántulas sometidas a salinidad incrementaron fuertemente su peso hacia el final del ensayo. Sin embargo, la relación PS/PF no mostró variaciones de significación entre ambos tratamientos (Tabla 1).

Pigmentos fotosintéticos.— Tanto la clorofila total como las isoformas *a-b* y los carotenoides exhibieron un crecimiento inicial en sus contenidos hasta alcanzar un máximo a los 12 días de desarrollo, para luego decrecer hacia final del ensayo (21^{avo} día). Si bien, el patrón distributivo resultó similar para ambos tratamientos, los niveles más elevados correspondieron a los cotiledones controles (Tabla 2). Resulta interesante destacar que en el 12^{avo} día, que corresponde a los niveles pigmentarios más altos, la diferencia en los contenidos de ambos tratamientos se hace mucho menor que en los estadíos iniciales y

finales del ciclo. La relación *clor. a/clor. b* no mostró cambios significativos entre ambos tratamientos durante los primeros 12 días de ensayo, pero sí hacia el final del mismo con los valores más altos para los cotiledones sometidos a salinidad.

Carbohidratos solubles.— El contenido de carbohidratos solubles totales, expresado en función del PS, exhibió un sostenido incremento a lo largo de la ontogenia cotiledonar para ambos tratamientos, aunque los valores resultaron superiores en las plántulas estresadas. Si bien, tanto los cotiledones control como los estresados incrementan los niveles de azúcares solubles a lo largo del ciclo, dicho aumento resultó mucho más marcado para los cotiledones provenientes del tratamiento salino con un incremento superior a las 4 veces en el 6^{to} y 21^{avo} días de desarrollo. Con relación a los carbohidratos solubles específicos, los resultados obtenidos mostraron para la glucosa y fructosa un sostenido incremento en sus niveles a lo largo del ensayo en los cotiledones estresados; sin embargo, mientras el contenido de glucosa entre el 12^{avo} y 21^{avo} días aumentó casi el 200%, el de la fructosa sólo lo hizo en un poco más del 20%. Las plántulas control exhibieron un comportamiento diferente por cuanto la glucosa sólo se incrementó un 78%, mientras la fructosa disminuyó el 23%. Respecto a la sacarosa, se observó un incremento en su contenido a lo largo del ensayo en los dos tipos de cotiledones; resultando los niveles significativamente superiores en los cotiledones sometidos a salinidad (Tabla

Días de tratamiento	*PF (mg) control	*PF (mg) estresados	*PS (mg) control	*PS (mg) estresados	PS/PF Control	PS/PF Estresados
6	15,45 \pm 4,54	16,45 \pm 5,27	1,60 \pm 0,45	2,25 \pm 0,82	0,103 \pm 0,055	0,136 \pm 0,092
12	22,72 \pm 5,12	36,36 \pm 6,52	1,40 \pm 0,18	1,88 \pm 0,22	0,061 \pm 0,027	0,052 \pm 0,036
21	26,72 \pm 4,28	78,18 \pm 6,28	1,60 \pm 0,52	4,25 \pm 0,37	0,060 \pm 0,027	0,054 \pm 0,009

Tabla 1. Peso fresco (PF), peso seco (PS) y relación peso seco/peso fresco (PS/PF) de cotiledones de quinoa control y desarrollados en presencia de sal a lo largo del ciclo ontogénico. (*) Corresponde al peso de 5 pares de cotiledones.

Días de tratamiento	Clor. total $\mu\text{g g}^{-1}$ PS control	Clor. total $\mu\text{g g}^{-1}$ PS estresados	Clor. a $\mu\text{g g}^{-1}$ PS control	Clor. a $\mu\text{g g}^{-1}$ PS estresados	Clor. b $\mu\text{g g}^{-1}$ PS control	Clor. b $\mu\text{g g}^{-1}$ PS estresados	Clor. a/b control	Clor. a/b Estresados	Carotenoides $\mu\text{g g}^{-1}$ PS control	Carotenoides $\mu\text{g g}^{-1}$ PS estresados
6	467 \pm 40	247 \pm 8	376 \pm 32	196 \pm 12	91 \pm 12	51 \pm 6	4,1 \pm 0,1	3,8 \pm 0,2	88 \pm 2	25 \pm 3
12	553 \pm 33	507 \pm 36	427 \pm 47	375 \pm 22	126 \pm 22	112 \pm 14	3,4 \pm 0,2	3,3 \pm 0,1	93 \pm 8	72 \pm 10
21	360 \pm 31	153 \pm 16	255 \pm 26	127 \pm 14	105 \pm 11	26 \pm 4	2,0 \pm 0,1	4,9 \pm 0,1	51 \pm 8	39 \pm 4

Tabla 2. Contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides) en cotiledones de quinoa control y estresados durante el ciclo ontogénico.

Días de tratamiento	Az. solub. totales $(\mu\text{mol g}^{-1}$ PS) control	Az. solub. totales $(\mu\text{mol g}^{-1}$ PS) estresados	Glucosa $(\mu\text{mol g}^{-1}$ PS) control	Glucosa $(\mu\text{mol g}^{-1}$ PS) estresados	Fructosa $(\mu\text{mol g}^{-1}$ PS) control	Fructosa $(\mu\text{mol g}^{-1}$ PS) estresados	Sacarosa $(\mu\text{mol g}^{-1}$ PS) control	Sacarosa $(\mu\text{mol g}^{-1}$ PS) estresados
6	47 \pm 2	65 \pm 3	10 \pm 2	35 \pm 2	25 \pm 3	12 \pm 2	14 \pm 2	18 \pm 2
12	100 \pm 8	150 \pm 4	42 \pm 2	80 \pm 7	35 \pm 6	20 \pm 6	27 \pm 4	38 \pm 3
21	130 \pm 6	265 \pm 8	75 \pm 3	148 \pm 4	27 \pm 6	25 \pm 4	35 \pm 3	51 \pm 2

Tabla 3. Contenido de azúcares solubles totales, glucosa, fructosa y sacarosa en cotiledones de quinoa control y estresados durante el ciclo ontogénico.

3). Al analizar el contenido de los carbohidratos solubles totales y específicos en función del PF, se obtuvo un patrón similar al observado en relación al PS (no mostrado).

Lípidos.— Si bien para todos los lípidos analizados los contenidos más altos se observaron siempre en los cotiledones controles, las variaciones de mayor significación correspondieron a los fosfolípidos y esteroides. El patrón distributivo resultó bastante similar en casi todos los casos, con un aumento sostenido en el contenido lipídico hasta el 12^{avo} día para luego disminuir más suavemente hacia 21^{avo} día. La relación fosfolípidos/glicolípidos si bien, no mostró variaciones de significación a lo largo de todo el ciclo para cada tratamiento, los valores resultaron inferiores en los cotiledones estresados (Tabla 4).

Proteínas solubles y prolina.— El contenido proteico resultó muy superior en los cotiledones control respecto a los estresados, con valores superiores al 400% al 6^{to} día de iniciado el cultivo. Si bien, los niveles iniciales de proteínas en las plántulas control fueron altos, mostraron una fuerte caída a lo largo del ensayo con una disminución cercana al 60% al 21^{avo} día. Por el contrario, en los cotiledones provenientes de plántulas crecidas en presencia de sal el contenido proteico mostró pocas variaciones durante todo el ciclo de cultivo. El contenido de prolina no mostró diferencias significativas entre los cotiledones estresados y controles hasta el 12^{avo} día de desarrollo; sin embargo, a partir de dicho punto se observó un fuerte incremento superior al 600% en los controles, mientras que en los estresados dicho aumento fue mucho menor (+170%) (Tabla 4).

DISCUSIÓN

El término ontogenia lleva implícito el concepto de senescencia que puede ser definido como el mecanismo que, controlado genética y hormonalmente, lleva cuenta de la edad de un individuo u órgano; el cual, después de un determinado tiempo más o

Días de tratamiento	Fosfol. $\mu\text{mol g}^{-1}$ PS control	Fosfol. $\mu\text{mol g}^{-1}$ PS estresado	Esterol. $\mu\text{mol g}^{-1}$ PS control	Esterol. $\mu\text{mol g}^{-1}$ PS estresado	Glicol. $\mu\text{mol g}^{-1}$ PS control	Glicol. $\mu\text{mol g}^{-1}$ PS estresado	Prot. sol. mg g^{-1} PS control	Prot. sol. mg g^{-1} PS estresado	Prolina mg g^{-1} PS control	Prolina mg g^{-1} PS estresado	Fosfol./Glicol. control	Fosfol./Glicol. estresado
	6	25 ± 4	9 ± 1	54 ± 6	22 ± 2	49 ± 4	31 ± 2	263 ± 6	63 ± 2	0,12 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,51 ± 0,04
12	41 ± 3	23 ± 1	84 ± 4	57 ± 4	66 ± 4	60 ± 1	180 ± 6	83 ± 2	0,15 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,61 ± 0,03	0,38 ± 0,04
21	37 ± 2	16 ± 1	73 ± 3	35 ± 4	60 ± 5	52 ± 3	103 ± 4	60 ± 1	0,80 ± 0,06	0,26 ± 0,03	0,62 ± 0,02	0,31 ± 0,02

Tabla 4. Contenido de lípidos (fosfolípidos, esteroides y glicolípidos), relación esteroides/fosfolípidos, proteínas solubles y prolina en cotiledones de quinoa control y estresados durante el ciclo ontogénico.

menos fijo conduce a su declive y eventual desaparición (Pennell & Lamb, 1997). Durante el ciclo ontogénico tiene lugar una serie gradual de cambios metabólicos que confluyen hacia la senescencia y disfuncionalidad del órgano o individuo. Dichos cambios se producen, inexorablemente, en un predefinido período de tiempo; sin embargo, factores ajenos a los mismos tales como las alteraciones medioambientales, pueden afectar su duración (Nooden, 1988). Los cotiledones no escapan a estas consideraciones y también poseen su propio ciclo ontogénico, cuya duración puede variar desde unos pocos días hasta varios meses (Ruffino, 2002). Al ser los cotiledones de la quinoa del tipo no reservante, su importancia en el establecimiento de la futura planta se manifiesta desde el mismo momento en que comienza su actividad fotosintética; razón por la cual, resulta de gran interés conocer como afectan a la misma las situaciones de estrés, tal el caso de la salinidad. Los resultados obtenidos demostraron que el estrés salino provocó una disminución en el contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides) en los cotiledones de quinoa sometidos a 230 mM de NaCl. Si bien, los niveles resultaron menores en los cotiledones estresados, las diferencias no fueron tan pronunciadas como las observadas en otras especies más sensibles a la salinidad (Seemann & Critchley, 1985). Este hecho, llevaría a suponer que los mecanismos de resistencia a la salinidad operantes a nivel celular en la quinoa, que es una especie halófila, incluirían algún tipo de protección para el metabolismo de los pigmentos fotosintéticos a fin de asegurar su funcionalidad. No obstante, la posible operatividad de un supuesto mecanismo protector más o menos específico para la actividad fotosintética, la disminución observada en el contenido de los pigmentos fotosintéticos en los cotiledones de quinoa en presencia de sal, podría deberse, ya sea, a una menor actividad biosintética o a un aumento de los procesos oxidativos intracloroplastídicos con el consiguiente incremento del catabolismo pigmentario mediado por las especies reactivas de oxígeno (Elst-

ner, 1982; Foyer *et al.*, 1994; Casano *et al.*, 1997). En apoyo de esta última suposición, los trabajos de Price *et al.* (1989) y Hernández *et al.* (1995) han demostrado que ciertas condiciones de estrés como la sequía y la salinidad, inducen la producción de radicales libres de oxígeno en los cloroplastos. La posible participación de los radicales libres en la disminución del contenido pigmentario de los cotiledones desarrollados en presencia de sal, estaría avalada también por la prematura coloración amarillenta que exhiben estos cotiledones; de un modo similar a lo observado en *Phaseolus vulgaris* por Seemann & Critchley (1985), quienes demostraron que por efecto de los radicales libres de oxígeno las hojas de plantas sometidas a estrés salino presentan bordes amarillentos a los pocos días de cultivo. La relación *clor. a*/*clor. b* no mostró cambios significativos entre ambos tratamientos durante los primeros 12 días de ensayo, pero sí hacia el final del mismo con los valores más altos para los cotiledones sometidos a salinidad; lo que indicaría una cierta aceleración en el catabolismo pigmentario propio de la senescencia, inducido por la sal. Esta suposición estaría avalada por el hecho de que la isoforma *b* de la clorofila resulta más sensible que la isoforma *a*, a los procesos oxidativos que se generan en las situaciones de estrés (Hendry & Price, 1993).

En numerosas especies vegetales se ha demostrado que las condiciones mediamambientales desfavorables tales como la salinidad y sequía inducen la acumulación de azúcares solubles, prolina, polioles y glicina-betaína entre otros compuestos (Wang & Stutt, 1996; Zhu *et al.*, 1997; Yeo, 1998). En consonancia con esta aseveración, los cotiledones de quinoa provenientes de plántulas desarrolladas en presencia de sal mostraron también un incremento en el contenido de azúcares solubles; sobre todo, en glucosa y en menor medida en sacarosa. Si bien, el aumento en el contenido de sacarosa en los cotiledones estresados puede deberse al estrés salino, no puede descartarse que dicho aumento sea causado por una baja en la actividad invertásica inducida por la sal como

fue demostrado por Prado *et al.* (1995) trabajando con plántulas de quinoa crecidas bajo condiciones de salinidad elevada. Sin embargo, los altos incrementos observados en los niveles de glucosa bajo condiciones de estrés no se corresponderían con el postulado anterior. En ese sentido, los mayores niveles de glucosa podrían tener su origen en un aumento de la degradación del almidón perispérmico o en una interconversión de hexosas. Esta suposición estaría avalada por el hecho de que los niveles de fructosa, el otro producto de la actividad invertásica, no sigue el patrón de crecimiento observado para la glucosa. Asimismo, ha sido demostrado que el estrés salino induce la interconversión de hexosas y otros carbohidratos como la sacarosa (Pfeiffer & Kutschera, 1996). No obstante, no puede descartarse tampoco el hecho de que los mayores niveles de carbohidratos presentes en los cotiledones estresados se deban a un decrecimiento general de la actividad metabólica inducida por la sal. En ese sentido, los menores niveles de carbohidratos observados en los cotiledones control podrían atribuirse, de acuerdo a Kruger (1990), a la mayor demanda metabólica necesaria para el desarrollo de nuevas partes de la plántula en crecimiento. Sin embargo, esta suposición no sería aplicable a los cotiledones de quinoa, por cuanto el PS resultó más alto en los cotiledones estresados que en los controles a lo largo de todo el ensayo (Tabla 1).

En quinoa, al igual que en jojoba (Ben Rais *et al.*, 1993), la salinidad produce una fuerte reducción en los niveles de proteínas solubles, a diferencia de lo que ocurre en cebada donde el estrés salino induce un incremento en el contenido proteico (Ramagopal, 1988). A medida que progresa el ciclo ontogénico de un determinado órgano tienen lugar una serie de cambios metabólicos que incluyen, entre otros, un aceleramiento de la actividad catabólica de diversos compuestos tales como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos (Buchanan-Wollaston, 1997). Los cotiledones de quinoa si bien, muestran una disminución en el contenido proteico a lo largo de su ciclo ontogénico, la

misma resultó mucho menos notable en el caso de los cotiledones estresados; los cuales, prácticamente casi no mostraron cambios a lo largo del ciclo. La aparente mayor velocidad proteolítica observada en los cotiledones control, podría explicar los mayores niveles de prolina libre detectados en dichos cotiledones hacia el final del ensayo; pero no de lo que ocurre al 6^{to} y 12^{avo} días, donde el contenido del aminoácido resultó algo más alto en los cotiledones estresados; a pesar del aparente menor grado de proteólisis que exhiben. Este hecho serviría para confirmar, una vez más, el importante rol que cumple la prolina como osmolito compatible en el estrés salino.

En relación a los lípidos, los menores niveles observados en los cotiledones estresados, si bien, provendrían de una menor actividad metabólica en estos cotiledones; no puede descartarse el hecho de que los mismos se produzcan como consecuencia de un aumento en la actividad gluconeogénica senescente inducida por la sal. En apoyo de esta suposición, del Río *et al.* (1998) demostraron que durante el proceso de senescencia ocurre una activa transformación de peroxisomas en glioxisomas, orgánulos que tienen una gran participación en la gluconeogénesis. Asimismo, Dangl *et al.* (2000) observaron que durante la senescencia se produce la inducción de los genes que codifican para la malato sintetasa e isocitrato liasa, enzimas que desempeñan un importante papel en el proceso gluconeogénico. De este modo, las alteraciones inducidas por la senescencia en el proceso gluconeogénico podrían también contribuir a las variaciones observadas en los niveles de carbohidratos solubles durante la ontogenia de los cotiledones de quinoa; lo que serviría para reafirmar la complejidad de las interrelaciones existentes en el metabolismo celular de las plantas. La relación fosfolípidos/glicolípidos, un indicador de la permeabilidad del plasmalema a los iones (Hirayama & Mihara, 1987), mostró variaciones significativas entre ambos tratamientos; siendo los valores de los cotiledones estresados más bajos que los correspondientes a los cotiledones control. Este hecho

resulta coincidente con lo observado para otras halófitas como *Kosteletzkya virginica*, cuyas raíces mantienen una baja relación fosfolípidos/glicolípidos bajo condiciones de salinidad elevada (Blits & Gallagher, 1990). Sin embargo, en *Beta vulgaris* esto no ocurre ya que en presencia de altas concentraciones de NaCl y elevado pH la relación fosfolípidos/glicolípidos se incrementa (Yahya *et al.*, 1995). La explicación dada para este comportamiento opuesto, considera que mientras en la primera de las especies la planta mantiene en todos sus órganos un bajo balance de Na^+/K^+ , la segunda, especialmente en sus hojas, acumula cantidades crecientes de sodio a medida que aumenta la edad de las mismas (Marschner *et al.*, 1981); lo que no ocurriría durante la ontogenia de los cotiledones de quinoa. No obstante, resulta necesario profundizar las investigaciones a fin de dilucidar plenamente el efecto del estrés salino sobre la ontogenia de los cotiledones de quinoa.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al aporte financiero del Consejo de Investigaciones de la UNT (CIUNT) y de la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT, Proyecto N° 23.153). Asimismo deseamos expresar nuestro sincero agradecimiento a la Facultad de Ciencias Naturales e IML y al Instituto de Ecología de la Fundación Miguel Lillo por la colaboración prestada.

REFERENCIAS

- Adam, P. 1990. Saltmarsh Ecology. Cambridge University Press, New York.
- Ames, B. N. 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods in Enzymology* 8: 115-118.
- Ben Rais, L., M. J. Alpha, J. Bahl, T. Guillot-Salomón & J. P. Dubacq. 1993. Lipid and protein contents of jojoba leaves in relation to salt adaptation. *Plant Physiology and Biochemistry* 31: 547-557.
- Bewley, J. D. & M. Black. 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. 2nd edn. Plenum Press, New York.
- Blits, K. C. & J. L. Gallagher. 1990. Effect of NaCl on lipid content of plasma membranes isolated from roots and cell suspension cultures of dicot halophyte *Kosteletzkya virginica* (L.) Presl. *Plant Cell Reports* 9: 156-159.
- Bohnert, H. J., D. E. Nelson & R. G. Jensen. 1995. Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell* 7: 1099-1111.
- Bolarín, M. C., A. Santa-Cruz, E. Cayuela & F. Pérez-Alfocea. 1995. Short-term solute changes in leaves and roots of cultivated and wild tomato seedlings under salinity. *Journal of Plant Physiology* 147: 463-468.
- Briens, M. & F. Larher. 1982. Osmoregulation in halophytic higher plants: a comparative study of soluble carbohydrates, polyols, betaines and free proline. *Plant Cell and Environment* 5: 287-292.
- Buchanan-Wollaston, H. W. 1997. The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 48: 181-199.
- Burnouf-Radosevich, M. 1988. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): A potential new crop. En: Bajaj, Y. P. S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 6 Crops II. Springer-Verlag, Berlin, pp. 386-404.
- Casano, L. M., L. D. Gómez, H. R. Lascano, C. A. González & V. S. Trippi. 1997. Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant and Cell Physiology* 38: 433-440.
- Cardini, C. E., L. F. Leloir & J. Chiriboga. 1955. The biosynthesis of sucrose. *Journal of Biological Chemistry* 214: 149-155.
- Chapelle, E. W. & M. S. Kim. 1992. Ratio analysis of reflectance spectra (RARS): an algorithm for the remote estimation of the concentration of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and carotenoids in soybean leaves. *Remote Sensing of Environment* 39: 239-247.
- Dangl, J. L., R. A. Dietrich & H. Thomas. 2000. Senescence and programmed cell death. En: Buchanan, B. B., W. Gruissem & R. L. Jones (eds.), *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Maryland, pp. 1044-1100.
- del Rio, L. A., G. M. Pastori, J. M. Palma, L. M. Sandalio, F. Sevilla, F. J. Corpas, A. Jiménez, E. López Huertas & J. A. Hernández. 1998. The activated oxygen

- role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology* 116: 1195-1200.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers & F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Elstner, E. F. 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annual Review of Plant Physiology* 33: 73-96.
- Flowers, T. J., P. F. Troke & A. R. Yeo. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* 28: 89-121.
- Foyer, C. H., M. Lelandais & K. J. Kunert. 1994. Photo-oxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* 92: 696-717.
- Gandarillas, H. 1983. Genética y origen. En: *La quinoa y la kañiwa. Cultivos andinos*. CIID (Centro Int. de Invest. para el desarrollo) IICA (Inst. Inteamericano de Cs. Agrícolas). Serie Libros y Materiales Educativos N° 40 Cap. 3: 45-64.
- Gorham, J., L. Y. Hughes & R. G. Wyn Jones. 1981. Low-molecular-weight carbohydrates in some salt-stressed plants. *Physiologia Plantarum* 53: 27-33.
- Hendry, G. A. F. & A. H. Price. 1993. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. En: Hendry, G. A. F. & J. P. Grime (eds.), *Methods in Comparative Plant Ecology*. Chapman & Hall, London, pp. 148-152.
- Hernández, J. A., E. Olmos, F. J. Corpas, F. Sevilla & L. A. del Río. 1995. Salt-induced oxidative stress in chloroplast of pea plants. *Plant Science* 105: 151-167.
- Hirayama, O. & M. Mihara. 1987. Characterization of membrane lipids of higher plants differing in salt-tolerance. *Agricultural and Biological Chemistry* 12: 3215-3221.
- Jacobsen, S. E. 1993. *Quinoa Chenopodium quinoa* Willd. A novel crop for European agriculture. Tesis Doctoral. The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark. 142 pp.
- Jacobsen, S. E., I. Jørgensen & O. Stølen. 1994. Cultivation of quinoa (*Chenopodium quinoa*) under temperate climatic conditions in Denmark. *Journal of Agricultural Science* 122: 47-52.
- Jørgensen, O. S. & B. Andersen. 1973. An improved glucose-oxidase-peroxidase-coupled assay for b-fructofuranosidase activity. *Analytical Biochemistry* 53: 141-145.
- Kruger, N. J. 1990. Carbohydrate synthesis and degradation. En: Dennis, D. T. & D. H. Turpin (eds.), *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Longman Scientific and Technical, England, pp. 59-76.
- Lowry, O. H., N. H. Rosebrough, A. L. Farr & R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lynch, M. J., S. S. Raphael, L. D. Meldon, P. D. Space, P. Hillis & M. J. H. Inwood. 1963. *Medical Laboratory Technology*. Saunders WB, London.
- Marschner, H. A., A. Kylin & P. J. C. Kuiper. 1981. Differences in salt tolerance of three sugar beet genotypes. *Physiologia Plantarum* 51: 234-238.
- Munns, R. 1993. Physiological process limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypothesis. *Plant Cell and Environment* 16: 15-24.
- Nooden, L. D. 1988. The phenomenon of senescence and aging. Whole plant senescence. En: Nooden, L. D. & A. C. Leopold (eds.), *Senescence and Aging in Plants*. Academic Press, San Diego, pp. 1-50.
- Patakas, A. & B. Noitsakis. 2000. Leaf age effects on solute accumulation in water-stressed grapevines. *Journal of Plant Physiology* 158: 63-69.
- Pennell, R. I. & C. Lamb. 1997. Programmed cell death in plants. *The Plant Cell* 9: 1157-1168.
- Pérez-Alfocea, F. & F. Larher. 1995. Effects of phlorizin and p-chloromercuribenzenesulfonic acid on sucrose and proline accumulation in detached tomato leaves submitted to NaCl and osmotic stresses. *Journal of Plant Physiology* 145: 367-373.
- Pfeiffer, I. & U. Kutschera. 1996. Sucrose metabolism and lipid mobilization during light-induced expansion of sunflower cotyledons. *Journal of Plant Physiology* 147: 553-558.
- Prado, F. E., J. A. González, M. Gallardo, M. Moris, C. Boero & A. Kortsarz. 1995. Changes in soluble carbohydrates and invertase activity in *Chenopodium quinoa* ("quinoa") developed for saline stress during germination. *Current Topics in Phytochemistry* 14: 1-5.
- Prado, F. E., C. Boero, M. Gallardo & J. A. González. 2000. Effect of NaCl on germination, growth, and soluble sugar content in *Chenopodium quinoa* Willd. seeds. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 41: 27-34.
- Price, A. H., N. M. Atherthon & G. A. F.

- Hendry. 1989. Plants under drought-stress generate activated oxygen. *Free Radical Research Communications* 8: 61-66.
- Ramagopal, S. 1988. Regulation of protein synthesis in root, shoot and embryonic tissues of germinating barley during salinity stress. *Plant Cell and Environment* 11: 501-515.
- Reimann, C. & S. W. Breckle. 1993. Sodium relations in Chenopodiaceae: a comparative approach. *Plant Cell and Environment* 16: 323-328.
- Risi, C. & N. W. Galwey. 1984. The Chenopodium grains in the Andes: Inca crops for modern agriculture. *Advances in Applied Biology* 10: 145-216.
- Roe, J. H. & N. M. Papadopoulos. 1954. The determination of fructose-6-phosphate and fructose-1,6-diphosphate. *Journal of Biological Chemistry* 210: 703-707.
- Roughan, P. G. & R. D. Batt. 1967. Quantitative analysis of sulpholipid [sulphoquinovosyl diglyceride] and galactolipids [monogalactosyl and digalactosyl diglycerides] in plant tissues. *Analytical Biochemistry* 22: 74-88.
- Ruffino, A. M. C. 2002. Evolución de metabolitos y pigmentos durante la ontogenia de cotiledones de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) sometidos a estrés salino. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Naturales e IML, Argentina. 48 pp.
- Seemann, J. R. & C. Critchley. 1985. Effect of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 164: 151-162.
- Ting, S. V. & R. L. Roussef. 1979. Proline content in Florida frozen concentrated orange juice and canned grapefruit juice. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 92: 143-145.
- Turner, L. B. 1990. The extend and pattern of osmotic adjustment in white clover *Trifolium repens* L. during the development of water stress. *Annals of Botany* 66: 721-727.
- Ungar, I. A. 1991. *Ecophysiology of Vascular Halophytes*, CRC Press, Boca Raton.
- Ungar, I. A. 1996. Effect of salinity on seed germination, growth and ion accumulation of *Atriplex patula* (Chenopodiaceae). *American Journal of Botany* 83: 604-607.
- Wang, Z. & G. W. Stutt. 1996. The role of carbohydrates in active osmotic adjustment in apple under water stress. *Journal of American Society for Horticultural Science* 177: 816-823.
- Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144: 307-313.
- Yahya, A., C. Liljenberg, R. Nilsson, S. Lindberg & A. Banas. 1995. Effects of pH and mineral nutrition supply on lipid composition and protein pattern of plasma membranes from sugar beet roots. *Journal of Plant Physiology* 146: 81-87.
- Yeo, A. 1998. Molecular Biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of Experimental Botany* 323: 915-929.
- Zenoff, A. M., M. Hilal, M. Galo & H. Moreno. 1994. Changes in roots lipid composition and inhibition of the extrusion of protons during salt stress in two genotypes of soybean resistant or susceptible to stress. Varietal differences. *Plant and Cell Physiology* 35: 729-735.
- Zhu, J. K., P. M. Hasegawa & R. A. Bresnan. 1997. Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16: 253-277.