



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S. C.

Programa de Estudios de Posgrado

**“DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE TOLERANCIA A SALINIDAD DE
PAULOWNIA IMPERIALIS (Siebold & Zuccarini) Y PAULOWNIA FORTUNEI
(Seemann & Hemsley) APLICANDO CLORURO DE SODIO EN CONDICIONES IN
VITRO.**

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

En el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Agricultura Sustentable)

Presenta:

Gloria Irma Ayala Astorga

Agosto, 2008.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:00 horas del día 10 del Mes de Abril del 2008, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE TOLERANCIA A SALINIDAD DE
PAULOWNIA IMPERIALIS (Siebold & Zuccarini) Y PAULOWNIA FORTUNEI
(Seemann & Hemsley) APLICANDO CLORURO DE SODIO EN CONDICIONES
IN VITRO. "**

Presentada por el alumno:

Gloria Irma Ayala Astorga

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y
PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN

Agricultura Sustentable

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

DRA. LILIA ALCARAZ MELÉNDEZ
DIRECTOR DE TESIS

DR. JUAN ÁNGEL LARRINAGA MAYORAL
CO-TUTOR

DR. VLADIMIR LEBSKY
CO-TUTOR

DR. RAFAEL SALGADO GARCICLIA
CO-TUTOR

DR. ALEJANDRO E. CASTELLANOS VILLEGAS
CO-TUTOR

DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Comité Tutorial

Directora de tesis:

Dra. Lilia Alcaraz Meléndez Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S. México.

Comité Tutorial y Revisor de tesis:

Dra. Lilia Alcaraz Meléndez Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S. México.

Dr. Juan Ángel Larrinaga M. Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S. México.

Dr. Vladimir Lebsky Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S. México.

Dr. Rafael Salgado Garciglia Centro de Investigaciones Universidad de
Michoacán. Michoacán, México.

Dr. Alejandro E. Castellanos V. Centro de Investigaciones Científicas y
Tecnológicas de La Universidad de Sonora.
Hermosillo, Sonora. México.

Comité Sinodal de tesis:

Dra. Lilia Alcaraz Meléndez Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S. México.

Dr. Juan Ángel Larrinaga M. Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S. México.

Dr. Vladimir Lebsky Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S. México.

Dr. Rafael Salgado Garciglia Centro de Investigaciones de La
Universidad de Michoacán. Michoacán,
Michoacán. México.

Dr. Alejandro E. Castellanos V. Centro de Investigaciones Científicas y
Tecnológicas de La Universidad de Sonora.
Hermosillo, Sonora. México.

Dra. Alejandra Nieto Garibay (Suplente) Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S. México.

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes
Directora del Programa de Estudios de Posgrado
CIBNOR, S. C.

Prefacio

El presente trabajo se realizó en el DICTUS (Departamento de Investigaciones Científicas de La Universidad de Sonora), Hermosillo, Sonora y en el CIBNOR (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste), La Paz, B. C. S. como requisito para obtener el título de Doctor en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de Los Recursos Naturales con Orientación en Agricultura Sustentable.

El documento de tesis está sustentado en dos publicaciones propuestas y comprometidas en el Plan Trabajo Individual del sustentante (PTI):

1.- Ayala-Astorga, G. I. Alcaraz-Meléndez, L., Pacheco-Ayala F. and Alejandro E. Castellanos V. 2008. Effect of sodium chloride on *Paulownia imperialis* (Siebold & Zuccarini) and *Paulownia fortunei* (Seemann and Hemsley) plants growing *in vitro*. *Agrochimica* (en prensa).

2.- Ayala-Astorga, G. I. and Alcaraz-Meléndez. 2008. NaCl effect on protein, proline, TBARS and Pigments in *Paulownia imperialis* (Siebold & Zuccarini) and *Paulownia fortunei* (Seemann and Hemsley) *in vitro*. *Biocell* (enviada, en revisión)

Otras actividades realizadas como parte integral del Plan de Trabajo Individual son:

1.- Ayala-Astorga G. I., L. Alcaraz-Meléndez y F. Pacheco-Ayala. Contenido de sodio, potasio, calcio y magnesio en plantas de *Paulownia* bajo estrés salino *in vitro*. V Congreso del Noroeste. I Nacional en Ciencia Alimentarias y Biotecnología. Del 7 al 12 de Noviembre, 2005. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.

2.- Ayala-Astorga G. I. y L. Alcaraz-Meléndez. Efecto del Cloruro de sodio sobre el peso fresco y peso seco de *Paulownia imperialis in vitro*. V Simposio Internacional sobre la flora silvestre en Zonas Áridas. 29 al 31 de Marzo. 2006.

3.- Ayala-Astorga G. I. y L. Alcaraz-Meléndez. Efecto del cloruro de sodio sobre prolina y pigmentos en *Paulownia imperialis* (Siebold & Zuccarini) y *Paulownia fortunei* (Seemann & Hemsley) propagadas *in vitro*. Seminarios de La Academia de Ciencias Agrícolas. La Paz, Baja California Sur. Mayo, 2007.

4.- Ayala-Astorga. G. I. and L. Alcaraz-Meléndez. Efecto del cloruro de sodio sobre proteínas, enzimas y peroxidación de lípidos de la membrana en *Paulownia imperialis* y *Paulownia fortunei in vitro*. En el VIII simposio Internacional sobre Flora Silvestre en Zonas Áridas, del 12 al 15 de Marzo de 2008. La Paz, Baja California Sur, México.

Dedicatoria

A mi Señor Padre:

Sr. Aurelio Ayala Ibarra.

Quien siempre está conmigo y me enseñó la
RECTITUD, HONRADÉZ y RESPONSABILIDAD.

A mi señora Madre: Isabel Astorga Lugo Por su Gran Apoyo.

A mis Hermanos: Víctor, Roberto, Jesús Salvador, Manuel Ezequiel, Rosa Esthela,
José Aurelio y Bernardo por conservar nuestro Amor Fraternal.

A mis AMORES:

Bernardo, Edgardo y Gloria Irma

por ser:

MIS TRES AMORES.

A Bernardo Por Estar Siempre Conmigo

y Apoyarme en Mis Metas.

Agradecimientos

A Dios

A La Universidad de Sonora, por apoyar a los maestros e investigadores para que logren sus metas y fortalecer así su planta docente.

Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de La Universidad de Sonora (DICTUS), por apoyarme en mi superación académica y permitirme ser parte de su personal altamente calificado.

Al CIBNOR por otorgarme la oportunidad de ser uno más de sus orgullosos y reconocidos egresados.

Al personal del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del CIBNOR (Sergio, Margarito y Julio) por sus atenciones prestadas en el presente trabajo.

A PROMEP por el apoyo brindado para la realización del trabajo de tesis.

A la Doctora Lilia Alcaraz Meléndez por su gran visión al aportarme sus amplios conocimientos para el desarrollo del presente trabajo.

A los distinguidos miembros de mi comité de entrevista para admisión en el programa de doctorado, comité tutorial, así como a mis sinodales por su invaluable asesoría y brindarme la oportunidad de escuchar sus consejos y experiencias para el trabajo de tesis y en la defensa de la misma, especialmente al Dr. Vladimir Levsky.

Al personal de la Dirección de Posgrado y del DICTUS de La Universidad de Sonora, ya que sin su valioso apoyo no sería posible la culminación de mis estudios de doctorado.

Al personal de la Dirección de Posgrado del CIBNOR, por su gran apoyo incondicional para poder llegar al término del programa de estudios.

A todas las persona que me ayudaron para la realización del trabajo de tesis en sus diferentes etapas y me apoyaron para lograr mis metas.

Muchas Gracias a la Dra. Martha Elisa Rivas Vega (CESUES-Navojoa, Son) y al C. a Dr. José Manuel Llano Sotelo (DICTUS-Universidad de Sonora).

A aquellas personas que de alguna manera me apoyaron y me dieron palabras de ánimo para continuar en los momentos difíciles.

A TODOS y cada uno, Muchísimas Gracias!!!!!!

Índice de Contenido

	Página
Prefacio.....	iii
Comité tutorial.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Índice de contenido.....	vii
Índice de tablas.....	xi
Índice de figuras.....	xiv
Resumen.....	xvi
Abstract.....	xviii
1. Antecedentes.....	1
2. Introducción.....	3
2.1. Salinidad.....	3
2.2. Cultivo de tejidos.....	7
2.3. Cultivo de tejidos de <i>Paulownia</i>	8
2.4. Descripción de la planta de <i>Paulownia</i>	9
2.4.1. Florecimiento, fructificación y reproducción.....	11
2.4.2. Descripción de las semillas.....	11
2.4.3. Colecta, extracción y almacenamiento de las semillas.....	11
2.4.4. Características del cultivo de <i>Paulownia</i>	12
2.4.5. <i>Paulownia imperialis</i>	13
2.4.6. <i>Paulownia fortunei</i>	15
3. Hipótesis.....	17
4. Objetivos.....	17
4.1. Objetivo General.....	17

	Página
4.2. Objetivos específicos.....	17
5. Materiales y métodos.....	18
5.1. Germinación de semillas.....	18
5.2. Medio de cultivo.....	18
5.3. Establecimiento <i>in vitro</i>	18
5.4. Contenido de humedad.....	21
5.5. Área foliar.....	21
5.6. Número de estomas y tricomas.....	21
5.7. Determinación de pigmentos.....	22
5.8. Composición iónica.....	23
5.9. Determinación de proteínas.....	24
5.10. Determinación de peroxidasas.....	24
5.11. Determinación de TBARS (Peroxidación de lípidos).....	26
5.12. Determinación de catalasa.....	27
5.13. Determinación de prolina.....	27
5.14. Determinación de fotosíntesis.....	28
5.15. Diseño experimental.....	29
6. Resultados y discusión.....	30
6.1. Respuestas de las estructuras vegetativas al estrés por cloruro de sodio.....	30
6.1.1. Altura de <i>P. imperialis</i> y <i>P. fortunei</i>	30
6.1.2. Determinación de biomasa.....	32
6.1.3. Contenido de humedad.....	38
6.1.4. Área foliar.....	40
6.1.5. Número de estomas y tricomas.....	42

6.2. Respuestas bioquímicas al estrés por cloruro de sodio.....	48
6.2.1. Determinación de Pigmentos.....	48
6.2.2. Composición iónica.....	53
<i>Paulownia imperialis</i>	53
<i>Paulownia fortunei</i>	58
6.2.3 Relación (K^+/Na^+).....	63
6.2.4. Determinación de proteínas.....	65
<i>Paulownia imperialis</i>	65
<i>Paulownia fortunei</i>	65
6.2.5 Determinación de Peroxidasas.....	66
6.2.6 Determinación de TBAR (Peroxidación de lípidos).....	67
6.2.7 Determinación de catalasa.....	69
6.2.8 Determinación de Prolina.....	71
6.3 Respuestas fisiológicas al estrés por cloruro de sodio.....	74
6.3.1. Fotosíntesis en <i>Paulownia imperialis</i>	74
6.3.2. Respiración en <i>Paulownia imperialis</i>	74
6.3.3. Transpiración en <i>Paulownia imperialis</i>	75
6.3.4. Conductancia estomática en <i>Paulownia imperialis</i>	76
6.3.5. WUE (A/E) en <i>Paulownia imperialis</i>	78
6.3.6. CO_2 interno sobre CO_2 externo (C_i/C_a) en <i>P. imperialis</i>	78
6.3.7. Fotosíntesis en <i>Paulownia fortunei</i>	79
6.3.8. Respiración en <i>Paulownia fortunei</i>	80
6.3.9. Transpiración en <i>Paulownia fortunei</i>	80
6.3.10. Conductancia estomática en <i>Paulownia fortunei</i>	81
6.3.11 WUE (A/E) en <i>Paulownia fortunei</i>	82

6.3.12 CO ₂ interno sobre CO ₂ externo (Ci/Ca) en <i>Paulownia fortunei</i>	83
7. Conclusiones.....	85
8. Literatura citada.....	89
9. Apéndice I.....	106
Tabla 1. Escala de conductividad (milimhoscm ⁻¹ a 25° C).....	105
Tabla 2. Concentraciones de cloruro de sodio utilizadas.....	105
Tabla 3. Composición del medio de cultivo WPM.....	106

10. Apéndice II

1.- Ayala-Astorga, G. I. Alcaraz-Meléndez, L., Pacheco-Ayala F. and Alejandro E. Castellanos V. 2008. Effect of sodium chloride on *Paulownia imperialis* (Shielbold & Zuccarini) and *Paulownia fortunei* (Seemann and Hemsley) plants growing *in vitro*. Artículo aceptado para su publicación en la revista: Agrochimica.

2.- Ayala-Astorga, G. I. and Alcaraz-Meléndez. 2008. NaCl effect on proteín, proline, TBARS and Pigments in *Paulownia imperialis* (Shielbold & Zuccarini) and *Paulownia fortunei* (Seemann and Hemsley) *in vitro*. Artículo en revisión en la revista: Biocell.

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Efecto del NaCl (mM) sobre el contenido de humedad (%) en <i>Paulownia imperialis</i> en 15 y 30 días.....	38
Tabla 2. Efecto del NaCl (mM) sobre el contenido de humedad (%) en <i>Paulownia fortunei</i> en 15 y 30 días.....	39
Tabla 3. Número de estomas mm ⁻² y tricomas mm ⁻² en haz y envés de hojas de <i>Paulownia imperialis</i> con cloruro de sodio en 15 y 30 días.....	43
Tabla 4. Número de estomas mm ⁻² y tricomas mm ⁻² en haz y envés de hojas de <i>Paulownia fortunei</i> con cloruro de sodio en 15 y 30 días de incubación.....	46
Tabla 5. Efecto del cloruro de sodio (mM) sobre pigmentos (ngµg ⁻¹) de la parte aérea de <i>Paulownia imperialis</i> en 15 y 30 días de incubación.....	50
Tabla 6. Efecto del cloruro de sodio (mM) sobre pigmentos (ngµg ⁻¹) de la parte aérea de <i>Paulownia fortunei</i> en 15 y 30 días de incubación.....	52
Tabla 7. Efecto del cloruro de sodio sobre la composición iónica en hojas, tallos y raíces de <i>Paulownia imperialis</i> en 15 y 30 días de incubación.....	57
Tabla 8. Efecto de cloruro de sodio (mM) sobre la composición iónica de hojas, tallos y raíces de <i>Paulownia fortunei</i> en 15 y 30 días en incubación.....	62
Tabla 9. Relación K ⁺ /Na ⁺ de <i>Paulownia imperialis</i> y <i>Paulownia fortunei</i> en los niveles de salinidad.....	64
Tabla 10. Efecto del cloruro de sodio (mM) sobre proteínas (mgL ⁻¹) en <i>Paulownia imperialis</i> y <i>Paulownia fortunei</i> en 15 y 30 días.....	66

Tabla 11. Efecto del cloruro de sodio sobre la actividad específica de peroxidasas (Umgproteína ⁻¹) de <i>Paulownia imperialis</i> y <i>Paulownia fortunei</i> en 30 días de incubación.....	67
Tabla 12. Efecto del cloruro de sodio sobre TBAR (nmol TBARS mg de proteína ⁻¹) en <i>Paulownia imperialis</i> y <i>Paulownia fortunei</i> en 15 y 30 días de incubación.....	69
Tabla 13. Efecto del cloruro de sodio sobre la actividad de catalasa (Umg de proteína ⁻¹) en <i>Paulownia imperialis</i> y <i>Paulownia fortunei</i> en 30 días de incubación.....	70
Tabla 14. Efecto del cloruro de sodio (mM) sobre la fotosíntesis, respiración y transpiración en <i>Paulownia imperialis</i>	76
Tabla 15. Efecto del cloruro de sodio (mM) sobre la Conductancia estomática, en <i>Paulownia imperialis</i>	77
Tabla 16. Efecto del cloruro de sodio (mM) sobre WUE y Ci/Ca en <i>Paulownia imperialis</i>	79
Tabla 17. Efecto del cloruro de sodio (mM) sobre la fotosíntesis, respiración y transpiración en <i>Paulownia fortunei</i>	81
Tabla 18. Efecto del cloruro de sodio sobre la Conductancia estomática (mmolm ⁻² s ⁻¹) en <i>Paulownia fortunei</i> en 19 y 26 días.....	82
Tabla 19. Efecto del cloruro de sodio sobre WUE y Ci/Ca en <i>Paulownia fortunei</i> en 19 y 26 días.....	84

Índice de figuras

	Página
Figura 1. <i>Paulownia imperialis</i> (syn. <i>P. tomentosa</i>).....	14
Figura 2. <i>Paulownia fortunei</i>	16
Figura 3. Siembra <i>in vitro</i> y Pruebas efectuadas en <i>Paulownia imperialis</i> y <i>Paulownia fortunei</i>	20
Figura 4. Efecto del cloruro de sodio (M) sobre la altura (cm) de <i>Paulownia</i> <i>imperialis</i> y <i>Paulownia fortunei in vitro</i> en dos semanas de incubación.....	31
Figura 5. Efecto del cloruro de sodio sobre el peso fresco y peso seco (mg) de <i>P. imperialis</i> en 15 y 30 días. 0 (control), 1(20 mM NaCl), 2 (40 mM NaCl), 3 (60 mM NaCl), 4 (80 mM NaCl) and 5 (160 mM NaCl).....	33
Figura 6. <i>Paulownia imperialis</i> mostrando su crecimiento en las condiciones de salinidad en 30 días.....	34
Figura 7. Efecto del cloruro de sodio sobre el peso fresco y peso seco (mg) de <i>P. fortunei</i> en 15 y 30 días. 0 (control), 1(20 mM NaCl), 2 (40 mM NaCl), 3 (60 mM NaCl), 4 (80 mM NaCl) y 5 (160 mM NaCl).....	36
. Figura 8. <i>Paulownia fortunei</i> mostrando su crecimiento en 30 días en las condiciones de salinidad.....	37
Figura 9. Efecto del cloruro de sodio sobre el área foliar en: A) <i>P. imperialis</i> y B) <i>P. fortunei</i> en 15 and 30 días.....	41

Figura 10. Imagen digital (100 μ) de *P. imperialis* mostrando:

- a) tricoma en haz sin sal. b) estomas y tricoma en envés sin sal. c) estomas y tricoma en envés en 40 mM de NaCl en 30 días. d) estomas y tricoma en envés en 60 mM de NaCl en 30 días. e) haz en 160 mM de NaCl en 30 días y f) envés en 160 mM en 30 días.....44

Figura 11. Imagen digital (100 μ) de *P. fortunei* mostrando: a) haz sin sal.

- b) estomas y tricoma en envés sin sal. c) estomas en haz con 60 mM de NaCl en 30 días. d) estomas y tricoma en envés en 60 mM. e) haz en 160 mM en 30 días. f) envés en 160 mM en 30 días.....47

Figura 12. Efecto del cloruro de sodio (mM) sobre prolina (μgg^{-1}) en *P. imperialis*

- en 30 días.72

Figura 13. Efecto del cloruro de sodio (mM) sobre prolina (μgg^{-1}) en *P. fortunei*

- en 30 días.....73

Resumen

En el presente estudio se desarrolló la técnica de cultivo de tejidos para propagar *Paulownia imperialis* y *Paulownia fortunei* y para llevar a cabo los experimentos. Se germinaron semillas de ambas especies en medios de cultivo WPM, ya desarrolladas las plántulas y con tamaño uniforme, de dos a tres meses de edad, se transfirieron a medios de cultivo conteniendo cloruro de sodio en diferentes concentraciones y se llevaron a cabo los análisis en dos períodos de tiempo, al cabo de los cuales se realizaron diferentes análisis bioquímicos, fisiológicos y estructurales para conocer los efectos del estrés salino sobre ambas especies de *Paulownia*.

Inicialmente se probó el medio de cultivo WPM con cloruro de sodio en concentraciones de: 0, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 y 1000 mM. Los resultados obtenidos sobre los efectos de la salinidad por cloruro de sodio en *Paulownia imperialis* y *Paulownia fortunei in vitro* indicaron que el cloruro de sodio en las concentraciones probadas afectó negativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas debido a que las plantas de ambas especies murieron a las dos semanas en los medios de cultivo conteniendo los niveles más elevados de NaCl. Por lo que se probaron otros rangos de concentraciones de cloruro de sodio que fueron: 0, 20, 40, 60, 80 y 160 mM y se llevaron a cabo las determinaciones a los 15 y 30 días de peso fresco en hojas, tallos y raíces, peso seco en hojas, tallos y raíces, contenido de humedad en hojas, tallos y raíces, área foliar, observaciones al microscopio, pigmentos, composición iónica de Na^+ , K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} en hojas, tallos y raíces, relación K^+/Na^+ , TBARS, determinación de proteínas y peroxidasas, determinación de catalasa y determinación de prolina a los

30 días. Se determinó fotosíntesis, respiración, transpiración, conductancia estomática, WUE y Ci/Ca en 19 y 26 días.

Los resultados muestran que el sodio tiene efectos tóxicos en ambas especies de *Paulownia*, provocando un desequilibrio de los nutrientes reduciendo el peso fresco y el peso seco así como el área foliar, también se disminuyeron los pigmentos como clorofila *a* y clorofila *b*, β -caroteno y violaxantina. Además se produjo un desbalance en las funciones metabólicas con el subsecuente desequilibrio en las reacciones fisiológicas de las plantas afectando el contenido de prolina y proteínas, la actividad de enzimas, así como fotosíntesis.

Los resultados de este estudio indican que ambas especies se pueden considerar moderadamente tolerantes al estrés provocado por cloruro de sodio aunque se observó una mejor adaptación de *Paulownia imperialis* a las condiciones de salinidad moderada.

Abstract

This study deals with tissue culture techniques that were developed to propagate *Paulownia imperialis* and *Paulownia fortunei* and to conduct experiments. Seeds of both species were germinated in WPM culture medium. Once the seedlings developed to a standar size, two to three months old, they were transferred to a culture medium containing sodium chloride in different concentrations. Biochemical, physiological and structurals analysis were performed in two periods of time to know the effects of saline stress on both *Paulownia* species.

Initially we tested WPM culture media with sodium chloride at concentrations: 0, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 and 1000 mM. The results on the effects of salinity by sodium chloride in *Paulownia imperialis* and *Paulownia fortunei in vitro* showed that sodium chloride concentrations adversely affected the growth and development of plants because the plants of both species died after two weeks in the culture medium with higher levels of sodium chloride. We tested other WPM culture medium WPM with different levels of sodium chloride with: 0, 20, 40, 60, 80 and 160 mM and performed determinations at 15 and 30 days of fresh weight in leaves, stems and roots, dry weight in leaves, stems and roots, water content in leaves, stems and roots, leaf area, observations with the scanning electron microscope, pigments, ionic composition such as Na^+ , K^+ , Ca^{++} and Mg^{++} in leaves, stems and roots, relationship K^+/Na^+ and TBARS, determination of protein and peroxidases, catalase, and proline content at 30 days and determinations of photosynthesis, respiration, stomata conductance, WUE and Ci/Ca in 19 and 26 days.

The results show that the sodium has toxic effects on both species of *Paulownia*, causing an imbalance of nutrients by reducing the fresh weight and dry weight as well as leaf area, and also decreased chlorophyll *a* and chlorophyll *b*, β -carotene and violaxanthin. In addition there was an imbalance in metabolic functions with the resulting disruption in the physiological reactions of plants to affect proline and proteins content, enzyme activity as well as photosynthesis.

The results of this study indicate that both species can be considered moderately tolerant to stress caused by sodium chloride although observed better adaptation of *Paulownia imperialis* in the moderate salinity conditions.

1. ANTECEDENTES

Las plantas en su vida enfrentan diferentes cambios ambientales que en ocasiones son condiciones adversas para su sobrevivencia. Entre esas condiciones perjudiciales para los vegetales se encuentra la salinidad, la cual constituye un problema serio a nivel mundial.

Las aguas de riego contienen algunas sales que eventualmente contribuyen a la salinidad de los suelos ocasionando pérdidas en la agricultura debido a que la sal en esos suelos daña a las células, órganos y tejidos del vegetal lo que repercute negativamente en las plantas inhibiendo su crecimiento provocando la disminución en la productividad de los cultivos. Para estos tipos de suelos es necesario buscar nuevas técnicas para incrementar el rendimiento de los cultivos así como su calidad.

Debido a la problemática existente, se deben buscar alternativas para regiones con suelos salinos, por lo cual es necesario seleccionar debidamente plantas tolerantes a la salinidad para efectuar plantaciones en esos suelos y poder así aprovecharlos.

La propagación asexual de plantas, específicamente la propagación asexual por cultivo de tejidos, constituye una ventaja para llevar a cabo estudios tendientes a lograr mejoramiento de plantas con la posibilidad de aplicarlas en la obtención de características determinadas que son importantes en la agricultura como la tolerancia a factores ambientales adversos como es el cloruro de sodio.

El género *Paulownia* es originario de China y Japón, pertenece a la familia Scrophulariaceae. También se le conoce como kiri, princess ó empress. Su nombre lo recibe en honor a Ana Paulovna, Gran Duquesa (1795-1865) hija del Zar Pablo I de Rusia. Es un árbol caducifolio que alcanza una altura de 10 a 30 metros. Se cultiva como árbol de alineación, formando grupos en jardines y como cortinas en caminos. Por sus grandes hojas y flores decorativas son utilizados como ornamental y como especies de intercultivos.

La importancia de este género, radica en que son árboles productores de madera de muy buena calidad, con la cual es posible construir marcos de espejos, de pinturas, así como también instrumentos musicales, muebles, pipas para fumar y postes. Es importante para la producción de papel. De su madera se puede hacer carbón para ser utilizado en juegos pirotécnicos.

Se ha comprobado que *Paulownia* crece bien en suelos pobres y tiene capacidad de adaptación a diferentes tipos de climas por lo cual es importante considerar su implementación con posibilidades de forestación. Tiene habilidad para recuperar áreas estresadas ecológicamente. Su sistema radicular penetra suelos compactados y contaminados. Es un fitorremediador incrementando el contenido orgánico de suelos degradados.

El árbol de *Paulownia* puede ser una alternativa para hacer productivos los suelos de las regiones áridas y semiáridas en nuestro país por lo que podrían ser utilizados.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Salinidad

Uno de los problemas que afectan seriamente a la agricultura es la salinidad en los suelos, ya que inhibe el crecimiento de las plantas y disminuye la productividad de las cosechas, un suelo con una conductividad eléctrica de 4 dSm^{-1} (mmhocm^{-1}) (40 mM) o mayor, se considera suelo salino (Rathinasabapathi, 2000; Cramer, 2002; Munns, 2002; Chinnusamy *et al.*, 2005) pero se ha visto que algunos cultivos hortícolas se ven seriamente afectados si la conductividad eléctrica en la zona de enraizamiento es mayor de 2 dSm^{-1} (Sánchez and Silvertooth, 1996). Se considera que 1.5 billones de hectáreas de terreno están afectadas por la salinidad, constituyendo uno de los problemas más grandes que actualmente perjudican a la agricultura (Song *et al.*, 2006). De los 237 millones de hectáreas de riego en el mundo, en 1992, la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) estimó que unos treinta millones de hectáreas estaban dañadas por la salinidad y se encontraban seriamente afectadas aproximadamente de sesenta a ochenta millones (Prieto, 1998).

En un suelo salino, las sales dañan a las células, tejidos y organelos de las plantas (Cha-um, 2006). La salinidad por sodio (Zhi and Spalding, 2004) en los suelos va en aumento y se prevee provocarán serios problemas en más del 50% de las tierras agrícolas para el año 2050 (Wang *et al.*, 2003) y perjudicar las cosechas en muchas regiones (Hasegawa *et al.*, 1986; Graifenberg *et al.*, 1996; Kumar *et al.*, 2003). El estrés por salinidad provoca severos daños en las plantas, como inhibición de la actividad enzimática,

disminución de la entrada de nutrimentos en las raíces, desnaturalización de proteínas y estructuras de la membrana. Sin embargo, la respuesta completa de las plantas al estrés por sales no se ha entendido claramente (Tsugane *et al.*, 1999), tal vez porque es necesario efectuar investigaciones de los mecanismos moleculares y fisiológicos del desequilibrio de los nutrimentos ocasionado por la sal como un componente en el estrés por salinidad en los vegetales (Song *et al.*, 2006).

Se ha mencionado que la sobrevivencia, biomasa y altura de la planta son características suficientes para conocer la tolerancia a la salinidad de los vegetales (Munns, 2002), también que la morfología es uno de los principales factores que influyen en la sobrevivencia y el crecimiento de las plantas. Los cambios en la morfología influyen en la capacidad de los vegetales para aceptar los nutrientes, agua, luz y es importante entender la respuesta morfológica cuando crecen en estrés salino para conocer el grado de tolerancia a ese estrés (Sun and Dickinson, 1995). La deficiencia de uno o más minerales esenciales puede ocasionar estrés nutrimental y afectar el crecimiento de los vegetales (Matthew, 2007). Con la salinidad se desencadena en las plantas un estrés osmótico, lo cual reduce la disponibilidad de agua por la planta y un estrés iónico que afecta al metabolismo y disponibilidad de nutrientes por los vegetales (Sánchez *et al.*, 2008).

Con el fin de tolerar la salinidad, las plantas han desarrollado un sistema antioxidante para eliminar a las especies reactivas de oxígeno (ROS), también denominadas especies activas de oxígeno (AOS) (Shalata and Tal, 1998; Vranová *et al.*, 2002), las cuales se acumulan debido a la salinidad (Chinnusamy and Zhu, 2003). Las ROS pueden dañar a las células iniciando procesos destructivos como peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, daños a clorofilas y a ácidos nucleicos (Apse, 2002). Sin embargo, las enzimas

antioxidantes como peroxidasas y catalasas y los antioxidantes no enzimáticos como los carotenoides son claves en la destoxificación de ROS (Andrews, 2002). La modulación de la actividad de esas enzimas puede ser determinante en la tolerancia de las plantas a estrés ambiental. Se ha estudiado la relación de la salinidad y enzimas antioxidantes (Alscher *et al.*, 1997; Sankhla *et al.*, 2006). Se ha reportado que la peroxidasa disminuye con estrés salino en tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) (Mittova *et al.*, 2004), mientras que en cebolla (*Allium cepa*) dicha enzima se incrementó en condiciones salinas (El-baky *et al.*, 2003). Catalasa se incrementó en cebolla con al aumentar la salinidad (El-baky *et al.*, 2003), en contraste disminuyó la catalasa con el incremento de la salinidad en el árbol frutal de *Zizipus* spp. (Sankhla *et al.*, 2006). También se ha reportado que el aumento de la salinidad ha provocado la degradación de pigmentos como clorofila *a* y clorofila *b* en espinacas (*Spinacia oleraceae*) (Di Martino *et al.*, 2003).

Cuando las plantas se someten a estrés, como condiciones salinas acumulan compuestos osmoprotectores en respuesta a ese estrés. También se les denomina osmolitos (Cushman, 2001) ó solutos compatibles porque aún cuando se encuentren en elevadas concentraciones no son tóxicos (McNeil *et al.*, 1999), no interfieren con las reacciones bioquímicas normales (Bohnert *et al.*, 1995) y pueden favorecer que se efectúen las reacciones bioquímicas en las plantas (Tester and Davenport, 2003). Hare y colaboradores (1998) propusieron que el incremento en la acumulación de osmolitos ó de estos compuestos osmoprotectores u osmoprotectantes en plantas constituye una estrategia para aumentar por lo menos una etapa en la tolerancia al estrés. Uno de los compuestos más comunes que se acumulan en este tipo de condiciones salinas, es la prolina (Chinnusamy *et al.*, 2005), este aminoácido se acumula debido a que se activa su síntesis y porque se

inactiva su degradación (Nanjo *et al.*, 1999; Borsani *et al.*, 2003; Kishor *et al.*, 2005). Aun cuando la acumulación de prolina puede ser diferente entre las especies de plantas que se encuentren en condiciones de estrés, existen dudas entre la habilidad que desarrollan las plantas para la acumulación de prolina en estrés y la tolerancia al estrés por salinidad. La tolerancia relativa al estrés por cloruro de sodio, puede deberse al efecto de la acumulación de prolina sobre el crecimiento, no sobre la tolerancia (Maggio *et al.*, 2002). Sin embargo, Sairam y Tyagi mencionan que en plantas existe una fuerte correlación entre los niveles altos de prolina y la capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales de salinidad elevada (Sairam and Tyagi, 2004), ya que la acumulación de ciertos metabolitos como la prolina, podría servir como una válvula segura para ajustar el estado celular redox durante el estrés (Cushman, 2001), además, por estudios genéticos y generación de transgénicos, se ha confirmado que la prolina puede incrementar la tolerancia al estrés abiótico en plantas (Xiong, and Zhu, 2002).

Por otro lado, en la gran mayoría de las plantas que están en estrés salino, el proceso de fotosíntesis disminuye, pero se ha observado que muchas especies son capaces de sobrevivir en condiciones extremas de sal (Maslenkova *et al.*, 1995) y la tasa fotosintética de algunas especies que toleran suelos salinos, puede permanecer sin variación en altas concentraciones de sal (Longstreth and Nobel, 1979). La salinidad influye sobre varias funciones metabólicas en las plantas no halófitas, afectando la fotosíntesis, respiración, reacciones enzimáticas, síntesis de carbohidratos, así como el transporte de los productos de la fotosíntesis y su uso en la producción de nuevos tejidos afectando así el crecimiento de las plantas (Kozłowski, 1997). Los estudios efectuados con los árboles leñosos *Acacia nilotica* y *Acacia tortilis*, que crecen en ambientes secos de África y Asia, señalan que son

capaces de crecer en suelos salinos, sin embargo, su repuesta al potencial de agua fue diferente debido a la pérdida de hojas, ya que *A. tortilis* pierde más temprano sus hojas que *A. nilotica* (Mehari *et al.*, 2005).

Se han efectuado numerosas investigaciones sobre la respuesta fisiológica de diferentes especies a la salinidad empleando técnicas de cultivo de tejidos, como los experimentos realizados con vid (Troncoso *et al.*, 1999; Cavagnaro *et al.*, 2006), papa (Farhatullah and Raziuddin, 2002); mora (Harinasut *et al.*, 2003), álamo (Watanabe *et al.*, 2000), arroz (Cha-um *et al.*, 2004a) y el árbol del neem (Cha-um *et al.*, 2004b) y se ha concluido que el cultivo de tejidos proporciona un medio eficiente para llevar a cabo dichos estudios.

2.2 Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos vegetal es una técnica que consiste en aislar una porción de la planta que se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida en condiciones ambientales controladas. Constituye el área de la biotecnología vegetal que se ha convertido en una herramienta muy valiosa para el humano, ofreciendo alternativas para la solución de un gran número de problemas relacionados con los vegetales, ya que ofrece técnicas que permiten la manipulación de plantas tendientes a su mejoramiento (Villalobos and Thorpe, 1993). Una de estas alternativas es la micropropagación, que es la propagación asexual de cualquier tejido de la planta en un ambiente de temperatura, luz y humedad controlado. En la actualidad, el cultivo de tejidos, tiene muchas aplicaciones entre las que se pueden citar: micropropagación ó clonación *in vitro* de plantas, producción de

metabolitos secundarios, conservación de germoplasma, además, unido a las técnicas de ingeniería genética, han hecho posible la transferencia directa de genes a los vegetales, con lo cual se abren las posibilidades para el mejoramiento de plantas cultivadas y la obtención de nuevos productos a partir de ellas (Pérez *et al.*, 1999). Así se han regenerado una gran cantidad de plantas herbáceas y leñosas (Fiorino and Loreti, 1987). También, se ha realizado el establecimiento *in vitro* de callos friables a partir de embriones inmaduros de naranja dulce (*Citrus sinensis* Osb.) cultivares “Acosta 6” y “Washington navel” y naranja agria (*C. aurantium* L.) (Jiménez y Guevara, 1995) para posteriormente regenerar plantas completas con características homogéneas. Se ha utilizado el cultivo de tejidos para obtener árboles de manzano (*Malus domestica* Borkh.) (Mc Means *et al.*, 2006).

Villalobos y Thorpe, (1995), mencionaron que la primer especie leñosa que se logró regenerar mediante el cultivo de tejidos fue el álamo blanco (*Populus tremuloides*) que es un árbol maderable, así como la primer gimnosperma fue *Pinus palustris* a partir de embriones. El olivo también se ha regenerado exitosamente a través del cultivo de tejidos (Jain and Ishii, 2003), logrando crecimiento vegetativo y florecimiento *in vitro* (Chaari-Rkhis *et al.*, 2006).

2.3 Cultivo de tejidos de *Paulownia*

Paulownia también ha sido objeto de estudios utilizando el cultivo de tejidos, como los trabajos efectuados por Rao (1993) con cortes de pecíolos de *Paulownia fortunei* en medio de cultivo MS con 4 μ M de ANA y 20 μ M de BAP, a los siete días de incubación de los cultivos, se observaron tallos en el 80% de las muestras, las que

fácilmente enraizaron a las trece semanas. Con *Paulownia elongata* se obtuvo alta frecuencia en la regeneración de plantas (93.7 % de eficiencia) utilizando medio de cultivo de Murashige and Skoog (MS) con 0.1 mgL^{-1} de ANA (ácido α -naftalenacético) y 1 mgmL^{-1} de BAP (bencilaminopurina), lograron 100% de enraizamiento al utilizar medio de cultivo WPM (Woody Plant Medium) con 1 mgmL^{-1} de AIB (Ácido Indol-3-butírico), al transplantar las plantas al suelo presentaron cerca de 100% de sobrevivencia (Ipekci *et al.*, 2001). *Paulownia elongata* se ha regenerado por cultivo de tejidos, obteniendo múltiples tallos de rápida regeneración a partir de puntas de pecíolos al utilizar medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) con $4 \text{ }\mu\text{M}$ de ácido α -naftalenacético (ANA) más $20 \text{ }\mu\text{M}$ de BAP, los tallos se desarrollaron en más de 80 % de las plantas obtenidas (Dimps *et al.*, 1993). Ipekci y Gozukirmizi (2003) desarrollaron un sistema reproducible para embriogénesis somática a partir de hojas y tejidos internodales de *Paulownia elongata*, para lo cual utilizaron combinaciones de los reguladores de crecimiento 6-BAP, ácido indol-3-acético (AIA), ANA, cinetina (KIN) y tiazurón (TZD). Los embriones obtenidos se encapsularon para producir embriones sintéticos.

En el presente estudio se aprovechó el cultivo de tejidos para efectuar estudios de salinidad con cloruro de sodio en *Paulownia imperialis* y *Paulownia fortunei*.

2.4 Descripción de la planta de *Paulownia*

El género *Paulownia* es originario de China y Este de Asia, está representado por nueve especies que se han introducido a Australia, Japón, Corea, Estados Unidos (desde

Montreal hasta Florida, así como en Missouri y Texas), en México también se encuentra pero no en grandes cantidades. Fue introducida por su valor ornamental durante el siglo XIX, es un árbol caducifolio que alcanza alturas que van de los nueve hasta los treinta metros en su madurez (Bonner, 1995).

Su ubicación taxonómica se señala a continuación:

REINO	Vegetal
DIVISIÓN	Embryophita
SUBDIVISIÓN	Angiospermas
CLASE	Dicotiledóneas
FAMILIA	Scrophulariaceae
GÉNERO	<i>Paulownia</i>
SUBGÉNERO	<i>Paulownia</i>
ESPECIES	<i>imperialis (tomentosa), fortunei, elongata, catalpifolia</i>

NOMBRES COMUNES Paulownia, árbol de la princesa, kiri, árbol empress

Son árboles adaptables y de crecimiento rápido, caducifolio. El tronco llega a medir un metro de diámetro, sus raíces alcanzan una longitud de hasta nueve metros de profundidad, es de copa ancha y ramas ascendentes. Sus hojas son opuestas y llegan a medir de 13 a 25 cm de longitud y 60 cm de ancho, la anchura de la copa puede sobrepasar fácilmente los diez metros (<http://www.agrodesierto.com/paulownia.html>) (Figuras 1 y 2).

2.4.1. Florecimiento, fructificación y reproducción

Presenta flores perfectas de colores blancas, azules y violetas (Figura 2), en forma de panículas terminales de hasta 25 cm de longitud, entre Abril y Mayo antes de que emerjan las hojas, los frutos son ovoides, en forma de cápsulas dehiscente de 3 a 4 cm de longitud, toman una coloración café cuando están maduras en Septiembre y Octubre y persisten en el árbol en el Invierno.

2.4.2. Descripción de las semillas

Las semillas están envueltas por una capa delgada, transparente, liviana, parecen pequeñas alas de 1.5 a 3 mm de longitud, cuando la cápsula se rompe y se abre en el árbol son fácilmente diseminadas por el viento (<http://www.agrodesierto.com/paulownia.html>). Los árboles comienzan a desprender su semilla de los ocho a los diez años de edad.

2.4.3. Colecta, extracción y almacenamiento de semillas

Los frutos secos se pueden colectar y abrir con la mano antes que los árboles dispersen sus semillas, también se pueden colectar cuando todavía estén verdes pero se deben secar completamente para su extracción. Un método de extracción es colocar las cápsulas secas en bolsas, las semillas y los fragmentos de cápsulas pueden después separarse por el aire.

Paulownia se reproduce principalmente por semillas. Sus flores son muy llamativas y debido a que aportan gran cantidad de materia orgánica son enriquecedoras del suelo. Para una buena floración es fundamental que los árboles se poden, la poda deberá ser ligera y después de la floración.

2.4.4. Características del cultivo de *Paulownia*

Prefiere suelos ligeros y ricos pero crece bien en suelos arenosos y es resistente al frío. *P. elongata* y los híbridos de *P. fortunei* con *P. elongata* soportan temperaturas de hasta menos veinte grados Celcius. Se ha visto que los vientos fuertes pueden dañar árboles ya establecidos (<http://www.agrodesierto.com/paulownia.html>).

El grado de tolerancia al pH varía en las diferentes especies: *P. elongata* y *P. tomentosa* soportan pH de 5 a 8.9. Los árboles ya desarrollados son resistentes a condiciones de aridez y sequía (<http://www.agrodesierto.com/paulownia.html>), se ha comprobado que las diferentes especies tienen habilidad para absorber calcio y magnesio, observándose que se desarrollan adecuadamente en suelos pobres (<http://www.idrc.ca/library/document/071235/071235e.htm>). Son árboles ornamentales, por lo que son utilizados en parques, campos de golf, paseos, ciudades, zonas industriales, etc.

Se cultiva como árbol de alineación y formando grupos en jardines. Los árboles se pueden cosechar desde el primero al segundo año para la producción de postes y para la producción de madera pueden ser cosechados desde los cinco a diez años (<http://www.agrodesierto.com/paulownia.html>).

Se considera que el árbol de *Paulownia* ahorra agua porque en una sola temporada de crecimiento es capaz de alcanzar un gran desarrollo, mientras que en otras especies se necesitan varios años para que puedan alcanzar un determinado crecimiento, como el pino (30 años). Además de ahorrar agua, su capacidad de crecimiento es de las más altas del reino vegetal. *Paulownia* podría ser plantada en zonas elevadas y secas ya que estos árboles constituyen una alternativa rentable y menos agresiva ecológicamente que otras especies ya establecidas como el eucalipto (<http://www.agrodesierto.com/paulownia.html>).

La atención a nivel mundial del género *Paulownia* se está incrementando ya que es una planta económicamente importante debido a que son árboles productores de madera ligera de muy buena calidad, con la cual es posible construir marcos para espejos y pinturas, así como también instrumentos musicales como guitarras de muy bajo costo, pipas para fumar, muebles, armarios, puertas y postes para diferentes usos (<http://www.idrc.calibrary/document/071235/071235e.htm>). Es una madera muy resistente ya que no se tuerce, no se deforma ni agrieta, es fácil de trabajar, admite una gran variedad de acabados, permite el uso de pinturas barnices y adhesivos (<http://www.agrodesierto.com/paulownia.html>). El procesado para la producción de papel es rentable aún cuando es de madera ligera, debido a que no contiene resinas y aceites por lo cual los costos de producción se disminuyen (<http://www.xerics.com/paulownia.html>). Además es posible utilizarla como forraje.

2.4.5 *Paulownia imperialis*

Es un árbol caducifolio, de copa ancha y ramas ascendentes, llega a medir de 10 a 18 m de altura y de diámetro 60 cm (Lazova *et al.*, 2004). Hojas opuestas de 13-25 cm de longitud. De color verde fuerte a oscuro, con pecíolos grandes cuando son jóvenes. Sus flores son de forma piramidal, de 30 a 40 cm en panículas terminales, son acampanadas de aproximadamente 5 cm de longitud, se forman en el otoño permaneciendo cerradas hasta la primavera, (<http://www.arbolesornamentales.com/Paulowniatomentosa.htm>). También se denomina *Bignonia tomentosa*; tomentosa debido a los finos tricomas que cubren sus hojas (<http://www.agrodesierto.com/paulownia.html>). Se cultiva en algunas regiones templadas y

subtropicales de México, su principal uso es como árbol de sombra y ornato en parques y jardines y en orillas de caminos; por la belleza de sus flores de color azul-violeta, se ha utilizado en la fabricación de pulpa para papel (Niembro, 1990). *Paulownia imperialis* (syn. *P. tomentosa*) es muy importante en los Estados Unidos debido a que hace más de 150 años aproximadamente que se naturalizó (Bergmann, 2003).



Figura 1. *Paulownia imperialis* (syn. *P. tomentosa*)

(<http://www.arbolesornamentales.com/Paulowniatomentosa.htm>).

2.4.6. *Paulownia fortunei*

Son árboles que alcanzan 22 m de altura y el tronco 70 cm de diámetro. Sus hojas son simples de 12 a 20 cm de longitud en forma de corazón, de flores grandes en racimos, muy olorosas, de color violeta, aparecen en la mitad de la primavera. Sus frutos se presentan en cápsulas ovales de 2.5 a 4 cm de longitud, con pequeñas y numerosas semillas aladas. (<http://www.cnr.vt.edu/DENDRO/dentrology/syllabus2/factsheet.cfm?ID=895>). Crece bien en suelos con pH de 5 a 8. Es la especie que presenta tolerancia a una gran diversidad de climas, ya que crece bien en climas mediterráneos, tropicales y subtropicales, soportando temperaturas de diez grados bajo cero (<http://www.agrodesierto.com/paulownia.html>). *Paulownia fortunei* puede alcanzar una altura de 8 m en cinco años, su madera se utiliza para repoblación forestal, rehabilitación de suelos, y tiene alto potencial como especie agroforestal (Muthuri *et al.*, 2005).



Figura 2. *Paulownia fortunei*

(<http://www.cnr.vt.edu/DENDRO/dentrology/syllabus2/factsheet.cfm?ID=895>)

La selección de plantas tolerantes a la salinidad es una buena alternativa para las regiones con problemas de suelos salinos en los que se pudieran efectuar plantaciones para poder aprovechar ese tipo de suelos.

Por lo anteriormente mencionado, en el presente estudio se pretende propagar a *Paulownia imperialis* y *Paulownia fortunei* por cultivo de tejidos y determinar los niveles de tolerancia a salinidad por cloruro de sodio *in vitro*. Así como elucidar los mecanismos bioquímicos, fisiológicos y estructurales de *P. imperialis* y *P. fortunei* en diferentes concentraciones de salinidad por cloruro de sodio.

3. HIPÓTESIS

El incremento en la concentración de cloruro de sodio, así como el incremento en el tiempo de exposición de los cultivos afecta el desarrollo y sobrevivencia de las plantas glicófitas, por lo que se esperaría la disminución en la biomasa y sobrevivencia en *Paulownia imperialis* y *Paulownia fortunei*, debido a que sus respuestas bioquímicas, fisiológicas y estructurales serán alteradas al ser sometidas a estrés por cloruro de sodio.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar la tolerancia a salinidad por cloruro de sodio de *Paulownia imperialis* y *Paulownia fortunei* bajo condiciones de desarrollo *in vitro*.

4.2 Objetivos Específicos

Determinar en que concentraciones de cloruro de sodio *P. imperialis* y *P. fortunei* pudieran sobrevivir a la toxicidad del sodio.

Evaluar el efecto del cloruro de sodio en estructuras vegetativas de *P. imperialis* y *P. fortunei* tomando como parámetros peso fresco, peso seco, contenido de humedad, área foliar, número de estomas y número de tricomas.

Evaluar las respuestas bioquímicas y fisiológicas de *P. imperialis* y *P. fortunei* al incrementarse el contenido de cloruro de sodio en el medio de cultivo analizando contenido de cationes en los tejidos, proteínas totales, enzimas, prolina, pigmentos y actividad fotosintética.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Germinación de semillas

Las semillas de *Paulownia imperialis* y *Paulownia fortunei* se desinfectaron (esterilización o asepsia superficial) para lo cual se sumergieron en etanol al 96% durante dos segundos, pasado este tiempo se sumergieron en hipoclorito comercial al 20% durante cinco minutos, se lavaron cinco veces con agua destilada estéril, y se inocularon asépticamente en frascos conteniendo 20 ml de medio de cultivo WPM (Trigiano and Gray, 2000) estéril (ver anexo).

5.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo WPM (Woddy Plant Medium) se preparó con agua destilada, el pH se ajustó a 5.8 y se esterilizó a una temperatura de 121°C y 15 libras de presión durante quince minutos en autoclave modelo Market Forge Sterilmatic. Cuando el medio de cultivo se solidificó, se llevó a cabo la inoculación de las semillas en los frascos de cultivo.

5.3 Establecimiento *in vitro*

La siembra de semillas en condiciones *in vitro*, se realizó en la campana de flujo laminar modelo Edge Gard Hood, la cual proporcionó un ambiente aséptico, ya sembradas las semillas en el medio de cultivo, se incubaron en un cuarto de cultivos con temperatura de 25±2°C, humedad relativa de 70% y fotoperíodo de 16 horas luz.

Las plantas germinadas en condiciones *in vitro* de dos o tres meses de edad y un tamaño uniforme de 80 a 90 mm, se transfirieron a medios de cultivo con cloruro de sodio

para llevar a cabo los ensayos de salinidad, sometiendo las plantas a estrés con cloruro de sodio. Inicialmente se efectuaron pruebas con las siguientes concentraciones de cloruro de sodio: 0, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 y 1000 mM

Posteriormente se probaron las concentraciones de cloruro de sodio: 0, 20, 40, 60, 80 y 160 mM.

A los quince y a los treinta días, así como a los 19 y 26 días de incubación se efectuaron los análisis que se muestran en la figura 3.

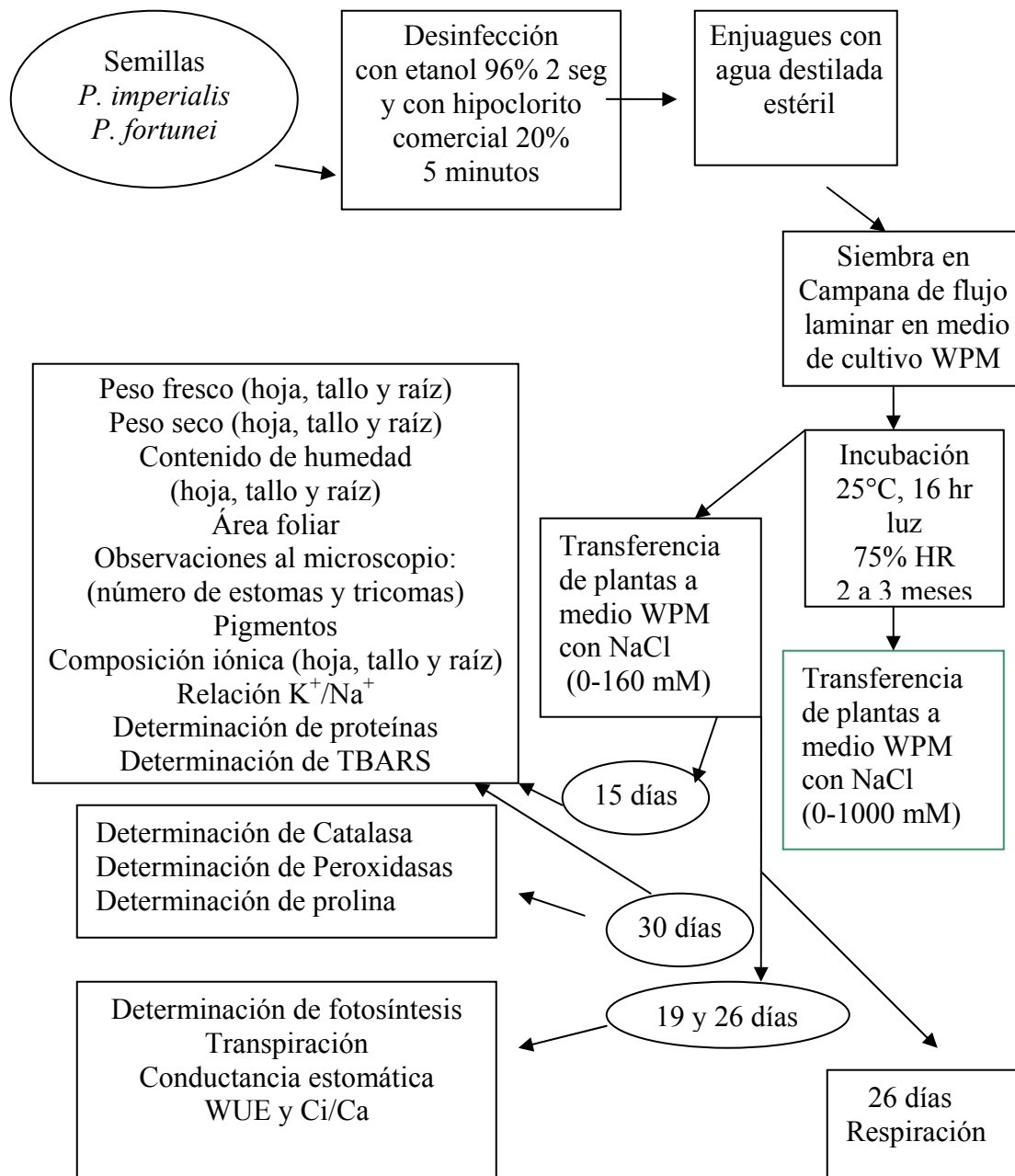


Figura 3. Siembra *in vitro* y Pruebas efectuadas en *Paulownia imperialis* y *Paulownia fortunei*

Se sacaron las plantas de los frascos de cultivo, se cortaron y pesaron las hojas, tallos y raíces para registrar la biomasa, obteniendo de manera directa el peso fresco. Para determinar el peso seco, cada una de las partes de la plántula se colocó en estufa a 70°C hasta peso constante y se pesaron. Se tomaron las muestras por separado de cinco plantas de todas las concentraciones de cloruro de sodio, tanto de 15 como de 30 días de incubación. Se efectuaron tres repeticiones en diferentes experimentos.

5.4 Contenido de humedad

El contenido de humedad se midió de acuerdo a Torres (1983) con la relación: (Peso fresco-Peso seco)/ Peso seco⁻¹ x 100

5.5 Área foliar

El área foliar se midió en hojas de las plantas a los 15 y 30 días por medio del programa Color it y el programa NIH Image 1.62.

5.6 Número de estomas y tricomas

Para determinar el número de estomas mm⁻² y número de tricomas mm⁻² en hojas se utilizó el microscopio electrónico de barrido (marca Hitachi S-30000N), fijando discos de hojas de 10 mm, sumergiéndolos en buffer de ácido cacodílico 0.1 M y glutaraldehído 2.5% (pH 7.0-7.4), después se refrigeraron por 10-12 horas y se lavaron colocándolas dos veces en agua destilada por 30 minutos. Después se sumergieron en alcohol etílico 30% por 30 minutos, después se colocaron en alcohol etílico 50% por 30 minutos y en alcohol etílico

70% durante 30 minutos siguiendo la técnica para fijar muestras de acuerdo a Hayat (1972). Se colocaron en etanol (70%), después en etanol al 96% y 100%. Después se deshidrataron con CO₂ hasta punto crítico en un secador SAMDRI-PWT-3B. Después las muestras se cubrieron con paladio con vacío (DESK II, Denton Vacuum). Las muestras se analizaron en el microscopio electrónico de barrido (SEM) S-3000 Hitachi Company. También se hicieron cortes transversales de los discos de hojas y se fijaron en portaobjetos para ser observadas en el microscopio óptico (Carl Zeiss STD, 25).

5.7 Determinación de Pigmentos

Los pigmentos se analizaron utilizando el HPLC (Modelo 1100, Hewlett Packard, Palo Alto, California) se tomó la parte aérea de tres plantas de cada concentración de cloruro de sodio, incluyendo al testigo, tanto de plantas de quince como de treinta días de incubación, se cortaron rápido y perfectamente con luz tenue colocándose en botellas de vidrio muy bien tapados, se congelaron y se liofilizaron, se pesaron de 1 a 3 mg y se colocaron en tubos eppendorff, bien sellados, se añadió 1 ml de acetona grado HPLC al 100%, se etiquetaron y se incubaron durante 24 horas a -20°C, pasado este tiempo se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a 5°C. El sobrenadante se recuperó con pipetas pasteur de vidrio limpias y se guardaron en frascos viales color ámbar, posteriormente se leyeron en el HPLC (Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución). Para la separación de los pigmentos se utilizó el método descrito por Vidussi et al, 1996 con una fase móvil conjugando dos soluciones: Solución A fue una mezcla de metanol-acetato de amonio 1N (70/30v/v) y la solución B: metanol grado HPLC al 100%. La fase estacionaria utilizada fue

una columna de 10 cm de longitud, 0.45 cm de diámetro y rellenas con partículas de sílice de 5 μm (Hypersil C8). El detector utilizado fue un arreglo de diodos con un rango de longitud de onda de 190-900 nm. Los pigmentos que se determinaron fueron: clorofila *a*, clorofila *b*, β -caroteno y violaxantina.

5.8 Composición iónica

Para el análisis de los iones (Na, K, Ca y Mg) se secaron hojas, tallos y raíces por separado según la técnica de AOAC Internacional, (AOAC, 1998), en estufa a 70°C hasta peso constante, se molieron en molino (Wiley GE mod 5KH390N5525A) con malla número 20, de acero inoxidable. Se pesaron 100 mg de cada muestra de ambas especies con las concentraciones ya mencionadas de NaCl y se colocaron en frascos de plástico perfectamente sellados. Los frascos de plástico se lavaron perfectamente con agua y jabón, se enjuagaron con agua deionizada, se mantuvieron en ácido clorhídrico durante cuatro días, se sumergieron en agua deionizada durante cuatro días, después se enjuagaron nuevamente con agua deionizada y se secaron a temperatura ambiente, se mantuvieron libre de polvo y humo en ambiente cerrado para ser analizadas posteriormente. La muestra se incineró a 450° por dos horas en una mufla marca Lindberg (Chapman, 1997). Se realizaron tres repeticiones. Se determinó sodio, potasio calcio y magnesio en el espectrofotómetro de absorción atómica marca Perkin-Elmer 3030, el gas utilizado para la flama fue el acetileno. Para la lectura del Na se utilizó la longitud de onda de 589 nm y para leer el K se utilizó 766.5 nm, el calcio se leyó con una longitud de onda de 422.7 nm, para el Mg fue 285.2 nm.

5.9 Determinación de proteínas

La determinación de proteínas solubles se hizo de acuerdo al método Bradford (Bradford, 1976), que consiste en utilizar el colorante azul de Coomassie, que en respuesta a la concentración de proteínas, reacciona con los residuos de aminoácidos básicos, especialmente la arginina. Se preparó una curva estándar con suero de albúmina bovina. Se colocaron 100 mg de tejido en tubo de ensayo con 2 ml de buffer de fosfatos 0.1 M a pH de 7.0, se homogenizó a 7000-12000 rpm, dependiendo del tejido. Se centrifugó a 3000 rpm 15 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó, se diluyeron las muestras 1:100 con la solución de homogenización.

Para preparar la curva estándar: En microplaca se adicionó: 155 μ L de agua destilada, 45 μ L del colorante Bradford, 25 μ L del estándar de albúmina. Se analizó por triplicado. Se preparó la muestra y se hizo la gráfica correspondiente y los cálculos se realizaron de acuerdo a la ecuación de la recta: $y=mx+b$, donde “x” es la concentración de proteína (mg/ml); “y” es la absorbancia, “b” es la ordenada al origen, “m” es la pendiente y “FD” es el factor de dilución. $X=[(y-b)]* FD$

5. 10 Determinación de peroxidasas

Para determinar peroxidasas, se utilizó la técnica descrita por Bergmeyer, (Bergmeyer, 1974).

1. Buffer de fosfatos 0.1 M a pH de 7.0.

Disolver $\text{Na}_3\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.1M y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1M en 1000 ml de agua deionizada.

2. Solución de guaiacol 20.1mM.

Diluir 0.224 ml de guaiacol (densidad 1.11 mgL^{-1}) en 100 ml de agua deionizada, mantener en refrigeración.

3. Solución de peróxido de hidrógeno (0.042%=12.3mM).

Diluir 14 μl en 10 ml de agua deionizada.

Preparar y utilizar en el mismo momento.

Con pipetas, transferir en cubetas o celdas de cuarzo:

- | | |
|---------------------------------------|-------------------|
| 1. Buffer de fosfatos | 2.9ml |
| 2. Solución de guaiacol | 50 μl |
| Muestra | 200 μl |
| 3. Solución de H_2O_2 | 30 μl |

Leer a 436 nm de absorbancia en espectrofotómetro cada 30 segundos. La actividad específica se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Act. esp.} = (V / E \times d \times v \times \text{Conc. de proteína}) \times \Delta E / \Delta t = u/\text{mg}$$

Donde:

V= Volumen final del ensayo

E= Coeficiente de extinción

d= Patrón de la luz= 1cm

v= volumen de la muestra utilizada en el ensayo

Conc. de proteína= mg/ml

ΔE = Cambio de extinción

Δt = Intervalo de tiempo entre medidas

5. 11 Determinación de TBARS (Peroxidación de lípidos)

Los hidroperóxidos y aldehídos lipídicos que resultan de la peroxidación de la membrana celular reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA), para formar malodialdehído (MDA), el cual es un pigmento rosa cristalino con absorción de 525 a 535 nm.

En un tubo se colocaron 2 ml de solución salina 0.9% con pH 7.0. El tubo siempre estuvo en hielo y se agregaron 100 mg de tejido fresco. Se homogenizó a una velocidad de 7000 a 12000 rpm.

En tubos eppendorf de 1.5ml se añadió 250µL del homogenizado. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Se incubó a 37° C de temperatura en un baño de agua con los tubos de la curva estándar durante quince minutos, pasado este tiempo, se sacaron los tubos y se colocaron en baño de hielo para detener la reacción. A cada tubo se adicionó 500µL de solución de TBA (Ácido tiobarbitúrico) (Sigma T5500), el cual debe estar en constante agitación. Los tubos se colocaron en baño de agua con una temperatura de 90° C agitando por diez minutos. Los tubos se mantuvieron cerrados y se colocaron en baño de hielo hasta enfriar. Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 4° C de temperatura. El sobrenadante se transfirió a celda de plástico para espectrofotómetro (Jenway 6505 UV/Vis) con pipeta de transferencia de 1.5 mL. El sobrenadante se leyó a 532 nm. Se calibró al aire. La cantidad de TBARS se calculó con una curva estándar utilizando 1,1,3,3-tetraetoxipropano en etanol grado reactivo diluido con solución salina 0.9% con 0.8 M de HCL/12.5% de TCA y 1% de TBA por 10 minutos a 100° C (Persky, *et al.* 2000).

5. 12 Determinación de catalasa

La determinación de catalasa se hizo de acuerdo a Aebi, (1984). Se homogenizan 100 mg de tejido fresco en 2ml de solución salina 0.9% a pH 7.0, se centrifugó a 300 rpm durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se mantuvo en hielo. El espectrofotómetro se calibró con agua destilada en celda de cuarzo a 240 nm. Las muestras se analizaron por triplicado. Se registró la absorbancia a 240 nm cada 15 segundos durante tres minutos. Se calculó el cambio de absorbancia a 240 nm por minuto como la pendiente de la recta en la gráfica.

La actividad de la catalasa se determinó con la ecuación siguiente:

$$\text{Unidades de catalasa/ml} = 0.0394 \times 1000$$

Donde 0.0394 es el coeficiente de extinción del H₂O₂ a 240 nm.

La concentración de proteína en cada muestra se corrigió con la fórmula:

Unidades de catalasa/mg de proteína = 0.0394 × 1000 / mg/ml de proteína en la muestra.

5. 13 Determinación de Prolina

La prolina se analizó cuando las plantas tenían 30 días en condiciones de salinidad utilizando el HPLC (Varian, Palo Alto, CA. modelo 9012) de acuerdo a la técnica descrita por (Vázquez *et al.*, 1995). Se tomó la parte aérea de tres plantas de cada concentración de cloruro de sodio, incluyendo al testigo, se cortaron colocándose en frascos de vidrio de 5 ml se taparon, se congelaron, posteriormente se liofilizaron, se pesaron 300 mg y se colocaron en tubos eppendorff, se añadió 1 ml de acetona calidad HPLC, se etiquetaron y se refrigeraron durante 18 horas, pasado este tiempo se centrifugó. El sobrenadante se recogió con pipetas pasteur de vidrio limpias y se guardaron en frascos viales. Se preparó el

extracto con la muestra, con TCA (Ácido tricloroacético) (Sigma T6399), 0.4 M de buffer borato y solución NBD-Cl (7-cloro-4-nitrobenzo 2 oxa-1,3-diazol) (2 mgmL^{-1} en metanol), se agitaron y la mezcla se calentó a 60° C por cinco minutos, la reacción se paró añadiendo $50 \mu\text{L}$ de HCl 1 M y por enfriamiento de la mezcla a 0° C por 30 minutos. Se analizaron en el HPLC. Se inyectaron $10 \mu\text{L}$ de la muestra a la columna (89-200-E3) de 10 cm de largo por 4.6 mm de diámetro, con tamaño de partícula de $3 \mu\text{m}$. La fase móvil (A) se preparó con buffer de acetato de sodio 0.1M y pH 7.2, como modificadores orgánicos se utilizaron metanol y tetrahidrofurano (900:95:5 v/v/v) (Sigma Chemical Co.) Para la fase móvil (B) el solvente utilizado fue metanol grado Merck. Los solventes se filtraron con filtros de $0.22 \mu\text{m}$ (Milipore corporation). Se usó estándar de prolina (Pierce Chemical Co.). El flujo fue 1 mLmin^{-1} de 25 a 29°C . El tiempo de reacción para la prolina fue de cinco minutos.

5. 14 Determinación de Fotosíntesis

La fotosíntesis se midió a los 19 y 26 días de incubación, se utilizó el equipo para medir fotosíntesis, modelo LCA-4 (ADC BioScientific). Se tomaron tres plantas completas de cada concentración de cloruro de sodio de ambas especies y se analizó la fotosíntesis en la tercera hoja verdadera de cada planta en luz y oscuridad. Con este equipo, también se determinó respiración, transpiración, conductancia estomática y se calculó la tasa instantánea de eficiencia de uso de agua (WUE) obtenida de la relación fotosíntesis sobre transpiración, también se calculó CO_2 interno/ CO_2 externo (C_i/C_a).

5. 15 Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Para determinar diferencias significativas entre tratamientos se utilizó el análisis de varianza de una vía. Al existir diferencias significativas entre tratamientos se efectuó la prueba de LSD de comparación de medias, con un nivel de significancia del 95%. Los resultados se analizaron estadísticamente por medio del programa StatGraphic, versión Plus para windows 1.4.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Respuestas de las estructuras vegetativas al estrés por cloruro de sodio.

6.1. 1. Altura de *P. imperialis* y *P. fortunei*

Las plantas de ambas especies de *Paulownia*, desarrolladas en condiciones *in vitro* en los medios nutritivos con las concentraciones de 0, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 y 1000 mM de cloruro de sodio en la primer semana de incubación tomaron coloraciones amarillentas y se necrotizaron en las concentraciones altas de salinidad. Los síntomas típicos de la toxicidad por sales son caída de hojas y necrosis; en el olivo (*Olea europaea* L.), estos síntomas aparecen por encima de 50 mM de NaCl, siendo más severos en elevadas concentraciones de sal; en la variedad de olivo, tolerante “kalamata” no se observaron síntomas de toxicidad en 200 mM de NaCl (Chartzoulakis, 2005), el cloruro de sodio incrementa los iones sodio en tejidos de las plantas y la acumulación de esos iones causa necrosis en las hojas (Turhan and Eris, 2007); en este estudio, a las dos semanas de incubación solamente las plantas con las concentraciones menores de cloruro de sodio: 50, 75 y 100 mM tanto de *P. imperialis* como *P. fortunei*, mostraron 43 mm de altura con 50 mM de NaCl; 23 mm y 32 mm con 75 mM y 13 mm y 6 mm de altura con 100 mM de NaCl respectivamente (Figura 4), como se puede observar, las plantas disminuyeron la altura y murieron con 200 mM de NaCl y concentraciones mayores. Estos resultados concuerdan con lo establecido por Wahome que las plantas responden al estrés salino disminuyendo su tasa de crecimiento formando hojas más pequeñas y menor cantidad de ellas, disminuyendo su altura (Wahome, 2003), sugiriendo que la tolerancia de las plantas a la salinidad puede ser determinado por su altura.

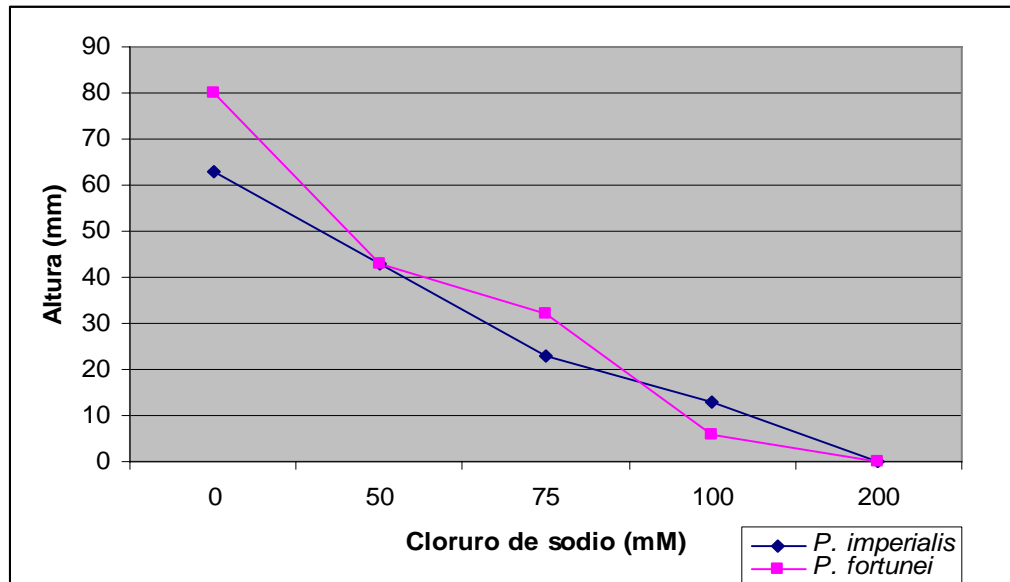


Figura 4. Efecto del cloruro de sodio (mM) sobre la altura (mm) de *Paulownia imperialis* y *Paulownia fortunei* *in vitro* en dos semanas de incubación.

Debido a los resultados anteriores y considerando que el crecimiento de *Paulownia* se vió seriamente afectado cuando el contenido de sales totales alcanza 170 mM (Yu, 1998), se utilizó la escala recomendada por Allison y colaboradores (Allison *et al.*, 1977), donde muestra los parámetros de tolerancia a la salinidad de los cultivos (Apéndice: Tabla 1). De acuerdo a los resultados preliminares en el presente trabajo ya no se utilizaron las concentraciones de cloruro de sodio de: 0, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 y 1000 mM y el experimento se realizó con: 0, 20, 40, 60, 80 y 160 mM de cloruro de sodio (Ver equivalencias en el apéndice; Tabla 2).

6. 1. 2 Determinación de biomasa

Paulownia imperialis

En la figura 5, se muestran los valores de peso fresco, peso seco de *P. imperialis* en 15 y 30 días de incubación en la cual se observa una disminución significativa del peso fresco y peso seco en raíces, tallos y hojas al incrementarse la salinidad. En la concentración de 160 mM de NaCl, se observó inhibición del crecimiento (Figura 6), lo cual indica daños a las células debido a los efectos perjudiciales del cloruro de sodio reduciendo la acumulación de biomasa. Estos resultados concuerdan con los trabajos efectuados por El-Sayed y colaboradores (1995) al trabajar con *P. tomentosa* var. Pallida en donde obtuvieron disminución del crecimiento. El peso seco de raíces en 30 días y el peso seco de tallos en 15 días de *P. imperialis* fueron iguales que el presentado por el testigo en la concentración de 20 mM de cloruro de sodio; en experimentos efectuados con *Vigna radiata* se obtuvieron resultados similares (Kumar and Sharma, 1989). El peso fresco de hojas de pera (*Pisum sativum* L.) se disminuyó con 70 mM de NaCl (Hernández *et al.*, 1993). En experimentos efectuados con arroz (*Oriza sativa*), no hubo producción de biomasa en siete días con 75 y 150 mM de NaCl (Moradi and Ismail, 2007).

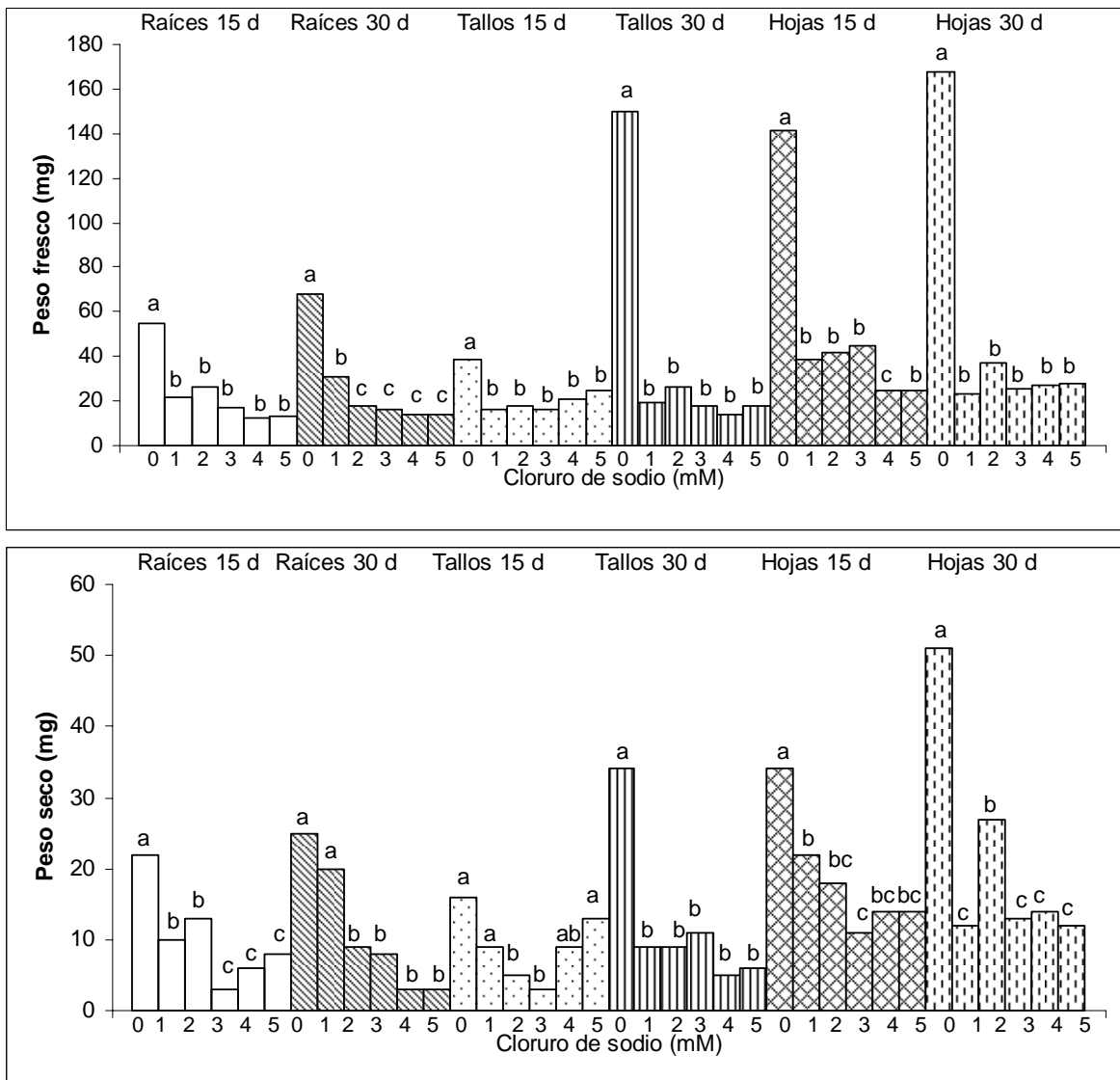


Figura 5. Efecto del cloruro de sodio sobre el peso fresco y peso seco (mg) de *P. imperialis* en 15 y 30 días. 0 (control), 1 (20 mM NaCl), 2 (40 mM NaCl), 3 (60 mM NaCl), 4 (80 mM NaCl) y 5 (160 mM NaCl). Las letras denotan una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre concentraciones de NaCl en 15 y 30 días para los distintos órganos.



Figura 6. *Paulownia imperialis* mostrando su crecimiento en las condiciones de salinidad en 30 días.

Paulownia fortunei

Una vez determinado el peso fresco en raíces, tallos y hojas en plantas de *P. fortunei*, a los 15 y 30 días de su cultivo en las condiciones de salinidad, no se observó un efecto en hojas y tallos en la disminución de estos parámetros a los 15 días con 20 mM de cloruro de sodio. Sin embargo, en el peso seco sí se observó efecto en hojas en 15 días desde la concentración de 40 a 160 mM de NaCl y en 30 días disminuyó significativamente en todos los niveles de salinidad, en tallos en 15 días disminuyó significativamente con 80 y 160 mM mientras que a los 30 días se observó la reducción significativa en el peso seco con 60, 80 y 160 mM, en raíces a los 15 días disminuyó el peso seco con 60, 80 y 160 mM de NaCl y en 30 días se redujo significativamente en todos los niveles de salinidad (Figuras 7 y 8). En experimentos efectuados con clavel en condiciones salinas, de 0 a 80 mM de NaCl, el peso del tallo se redujo significativamente en la concentración de 20 mM (Shannon and Noble, 1995). En *Lesquerella fendleri*, observaron que al incrementarse la salinidad, el peso seco disminuyó (Grieve *et al.*, 1999). La salinidad reduce el acceso de agua por la planta y disminuye el crecimiento del vegetal, el exceso de sales causa daños celulares a través del proceso de transpiración en las hojas y por toda la planta, por lo que el crecimiento se inhibe (Munns *et al.*, 2006).

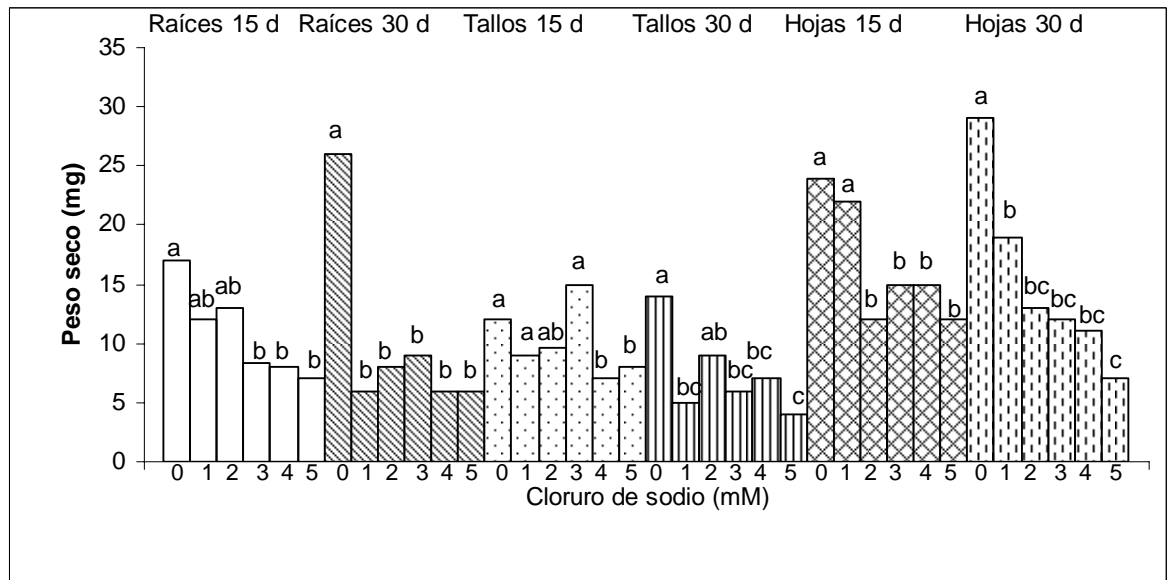
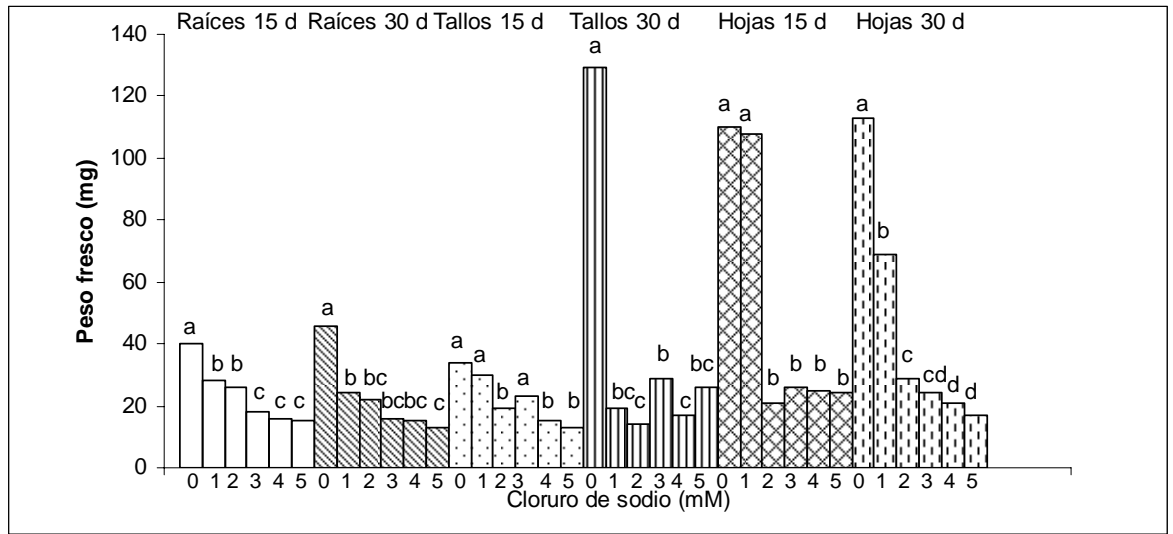


Figura 7. Efecto del cloruro de sodio sobre el peso fresco y peso seco (mg) de *P. fortunei* en 15 y 30 días. 0 (control), 1 (20 mM NaCl), 2 (40 mM NaCl), 3 (60 mM NaCl), 4 (80 mM NaCl) y 5 (160 mM NaCl). Las letras denotan una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre concentraciones de NaCl en 15 y 30 días para los distintos órganos.



Figura 8. *Paulownia fortunei* mostrando su crecimiento en 30 días de salinidad.

6.1.3 Contenido de humedad

En *P. imperialis* el contenido de humedad en hojas con 15 días disminuyó significativamente con el tratamiento salino, pero se observó una recuperación con 60 mM de NaCl, en 30 días disminuyó significativamente con 40 mM de NaCl. En tallos se observó una reducción significativa con 80 y 160 mM de NaCl, mientras que en 30 días no se observaron diferencias. En raíces con 15 días disminuyó significativamente este parámetro con 160 mM de cloruro de sodio y en 30 días disminuyó significativamente con 20 mM de NaCl (Tabla 1). El estrés salino ocasiona cambios en el contenido de agua y distribución de los iones provocando daños moleculares, disminución del crecimiento y la muerte de las plantas (Zhu, 2001).

Tabla 1. Efecto del NaCl (mM) sobre el contenido de humedad (%) en *Paulownia imperialis* en 15 y 30 días

NaCl		Contenido de humedad (%)					
		Raíces		Tallos		Hojas	
mM	días	15	30	15	30	15	30
0		56±19ab	62±25a	61±9.7 b	66±28 a	76±6.32 a	67±10 a
20		61±22ab	35±22b	47±26bc	54±13 a	45±13b	48±19 ab
40		55±23ab	57±11ab	72±5ab	62±3 a	54±20b	27±7 b
60		78±9a	57±11a	85±5 a	51±29 a	73±8a	57±26a
80		53±20ab	74±9a	61±14 b	63±21 a	44±10b	51±23 ab
160		39±16b	76±7a	51±22b	64±15 a	43±13b	51±22 ab

Las letras muestran diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre tratamientos de cloruro de sodio en 15 y 30 días. Media±DS(n=5).

En hojas de *P. fortunei* con 15 días en los niveles de 40, 60, 80 y 160 mM de salinidad se observó una disminución significativa en el contenido de humedad, mientras

que con 30 días, la reducción significativa de este parámetro se observó con 60 y 80 mM de cloruro de sodio. En tallos con 15 días en 60 mM y con 30 días en 40 mM se observó una disminución significativa respectivamente, en raíces con 15 días no se observaron diferencias significativas mientras que en 30 días se observó una disminución significativa con 60 mM de NaCl (Tabla 2). Se ha visto que la pérdida de agua ocasionada por alta salinidad en los tejidos genera deshidratación vegetal y se caracteriza por el incremento en la concentración de solutos y constituye uno de los grandes estreses abióticos más importantes para la productividad de los cultivos (Zyalalov, 2004).

Tabla 2. Efecto del NaCl (mM) sobre el contenido de humedad (%) en *Paulownia fortunei* en 15 y 30 días

NaCl		Contenido de humedad (%)					
		Raíces		Tallos		Hojas	
mM	días	15	30	15	30	15	30
0		56±17 a	43±12 bc	61±7 ab	88±2 a	68±3 a	73±9 a
20		58±17 a	73±6 ab	67±13 a	67±30 a	79±3 a	72±11 a
40		58±19 a	59±5 ab	48±26 ab	38±32 b	44±23 b	62±6 ab
60		51±13 a	40±18 c	37±22 b	78±11 a	44±25 b	48±14 b
80		52±16 a	59±6 a	65±24 a	52±22 ab	42±13 b	47±15 b
160		55±13 a	60±22 ab	43±25 ab	84±7 a	46±16 b	68±17 a

Las letras muestran diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre tratamientos de cloruro de sodio en 15 y 30 días. Media±DS(n=5).

6.1.4 Área foliar

Tanto en *Paulownia imperialis* como en *Paulownia fortunei*, el área foliar se redujo significativamente con el incremento de la salinidad (Figura 9), afectando la expansión foliar; la reducción en el crecimiento de la hoja ocasiona la disminución en el crecimiento de la planta (Cramer, 2002) (Figuras 5 y 7). El estrés por cloruro de sodio afectó la expansión de la hoja provocando la disminución del área foliar. Brugnoli and Björkman (1992), observaron una reducción del área foliar en algodón por la salinidad. En guayaba (*Psidium guajava*) reportaron resultados similares (Távora *et al.*, 2001). En plantas de fresa con 8.5, 17 y 34 mM de cloruro de sodio el área foliar disminuyó (Turhan and Eris, 2007), así como en mostaza (*Brassica juncea* L. Czern & Coss) cv. varuna con 25 y 50 mM de NaCl (Shah, 2007).

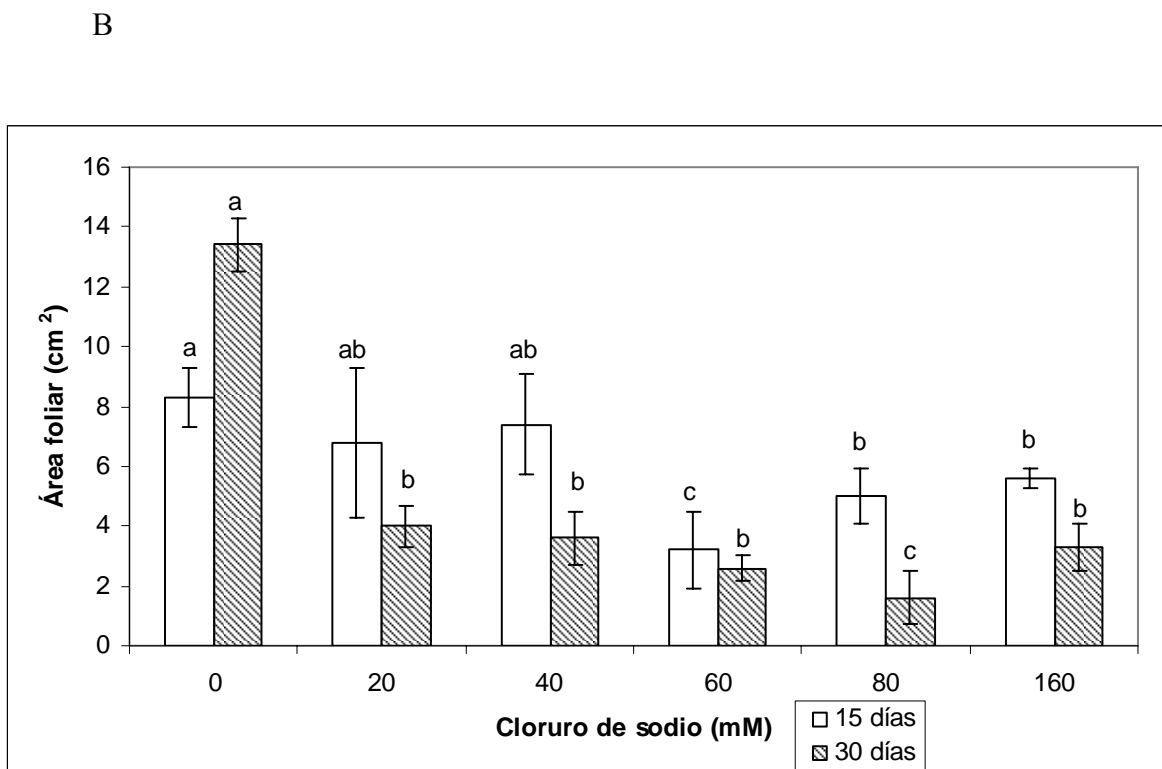
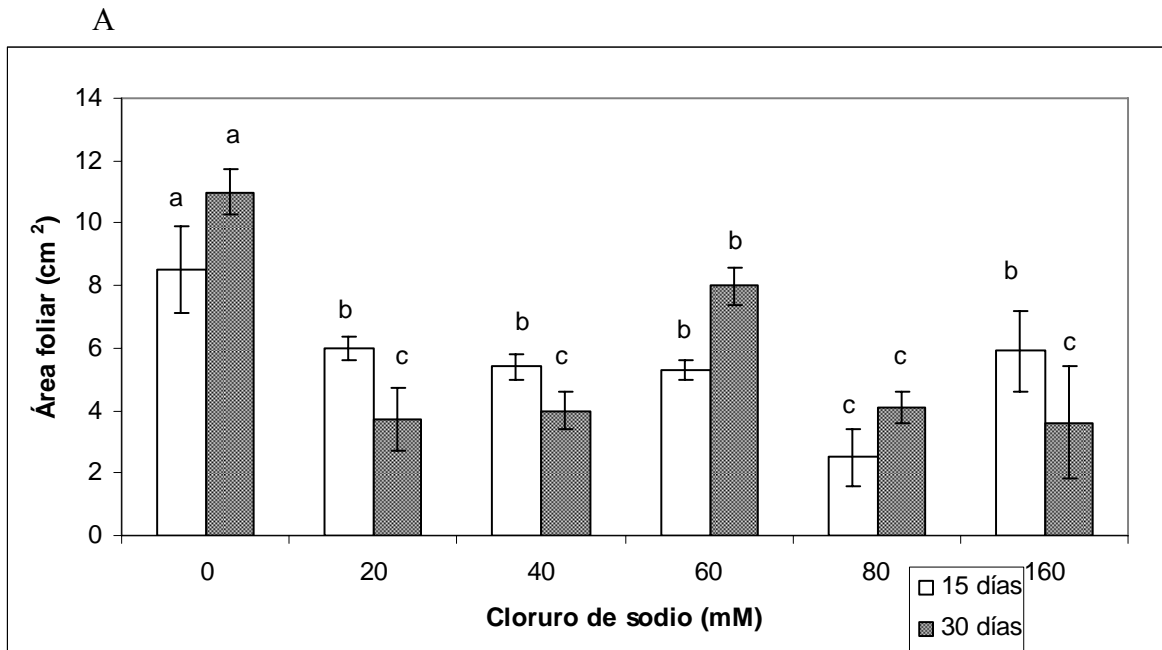


Figura 9. Efecto del cloruro de sodio sobre el área foliar en: A) *P. imperialis* y B) *P. fortunei* en 15 and 30 días.

6.1.5 Número de estomas y tricomas

Los estomas y tricomas de ambas especies se observaron con el microscopio electrónico de barrido y se contaron en las plantas tratadas con diferentes concentraciones de cloruro de sodio.

En la figura 10a se observa tricoma en haz de hojas de *P. imperialis* sin cloruro de sodio y en el envés se muestran estomas y tricoma (Figura 10b). No se observaron estomas en el haz. (Tabla 3). Mientras que en el envés, se observó que disminuyeron los estomas a medida que se incrementó la concentración de NaCl en ambos períodos de incubación (Tabla 3) (Figura 10c). En 15 días de incubación el número de tricomas detectado no varió con respecto al control en todas las concentraciones de cloruro de sodio probadas. En 30 días de incubación, al incrementarse las concentraciones de cloruro de sodio en el haz, se observó una disminución en el número de tricomas. El número de tricomas en el envés, no presentó variación con respecto al testigo en las concentraciones de NaCl probadas, en 15 días el número de tricomas en haz y envés fueron similares. En estudios realizados con almendra en estrés salino, encontraron que el cultivar Truoito tiene la habilidad de mantener los estomas abiertos en concentraciones altas de salinidad (Noitsakis *et al.*, 1989), se observaron resultados similares en el presente estudio, como lo muestran las figuras 10c, 10d y 10f en donde se observan abiertos la mayoría de los estomas a los 30 días con 40, 60 y 160 mM de NaCl respectivamente. En la figura 10e se puede observar haz con células epidérmicas colapsadas debido al exceso de cloruro de sodio.

Tabla 3. Número de estomas mm^{-2} y tricomas mm^{-2} en haz y envés de hojas de *Paulownia imperialis* con cloruro de sodio en 15 y 30 días de incubación

	Estomas				Tricomas			
	Haz		Envés		Haz		Envés	
	Días		Días		Días		Días	
NaCl (mM)	15	30	15	30	15	30	15	30
0	0	0	580	620	20	240	20	20
20	0	0	200	420	20	20	20	20
40	0	0	400	460	20	20	40	40
60	0	0	440	220	20	20	20	20
80	0	0	400	340	20	20	20	0
160	0	0	280	260	20	20	20	20

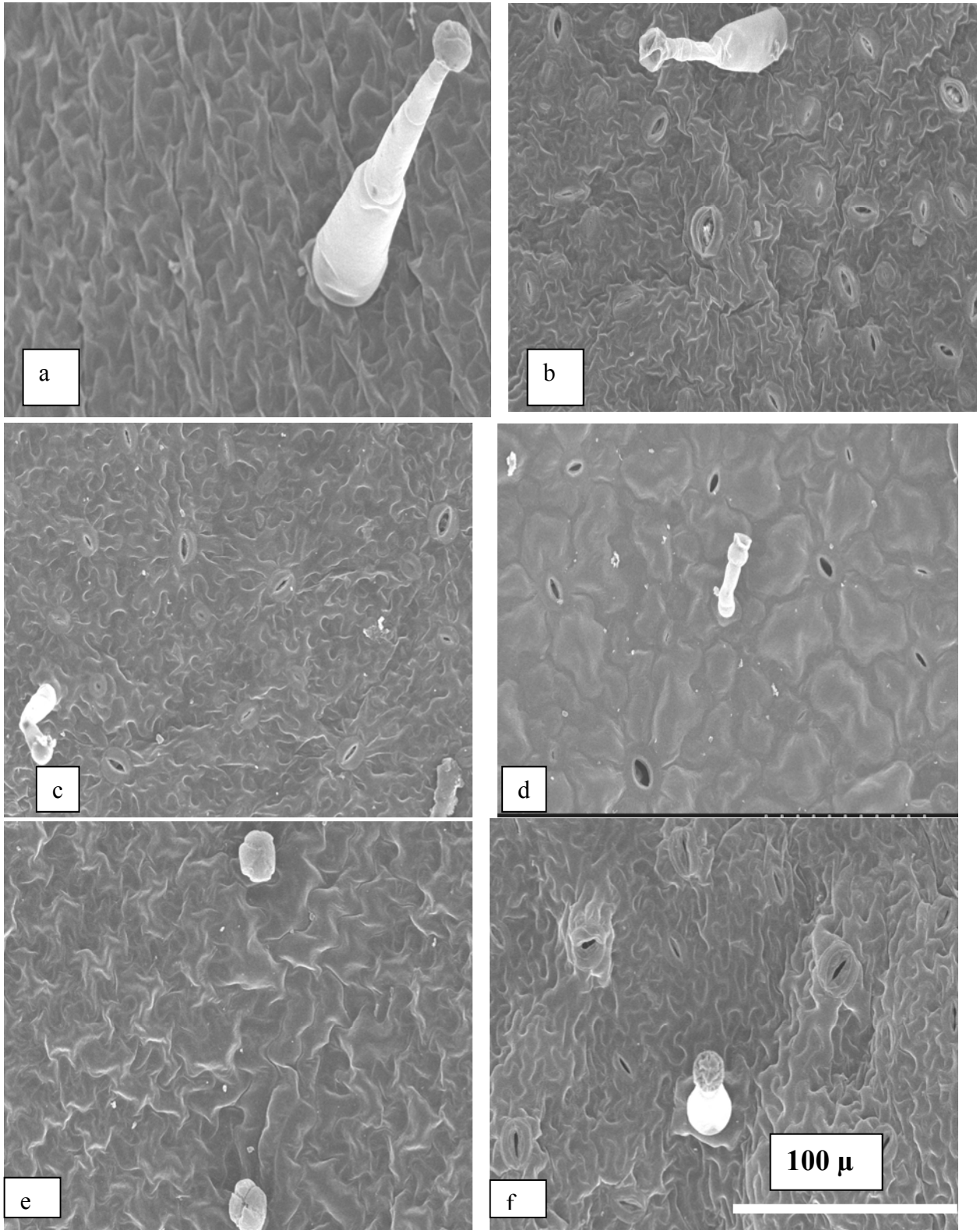


Figura 10. Imagen digital (100 μ) de *P. imperialis* mostrando: a) tricoma en haz sin sal. b) estomas y tricoma en envés sin sal. c) estomas y tricoma en envés en 40 mM de NaCl en 30 días. d) estomas y tricoma en envés en 60 mM de NaCl en 30 días. e) haz en 160 mM de NaCl en 30 días y f) envés en 160 mM en 30 días.

P. fortunei

La Tabla 4 muestra el número de estomas mm^{-2} y tricomas mm^{-2} en *P. fortunei* con las concentraciones de cloruro de sodio probadas. En la figura 11a se muestra el haz del control y en la figura 11b se muestran estomas y tricoma en envés del control. La figura 11c muestra el haz en 60 mM de cloruro de sodio en 30 días y en la figura 11d se observan los estomas en el envés en la misma concentración de NaCl. El número de tricomas observado presentó ligera variación con respecto al testigo en ambos tiempos de incubación en el haz, solamente en 30 días no hubo tricoma con 80 mM de cloruro de sodio. En las figuras 11 e y f se observan haz y envés con células epidérmicas colapsadas en 160mM de NaCl. En el envés se observó igual número de tricomas con respecto al testigo en 15 días de incubación, mientras que en 30 días no mostraron diferencias con respecto al testigo en las concentraciones de 40, 60 y 160 mM, observando cero en 20 y 80 mM de NaCl (Tabla 4). En experimentos efectuados con *Zoysiagrass*, se observó que a medida que se incrementó la densidad de los tricomas, se aumentó la tolerancia a la sal (Marcum et al, 2003), en el presente estudio, con *P. imperialis* y *P. fortunei* no se observaron estos resultados.

Tabla 4. Número de estomas mm⁻² y tricomas mm⁻² en haz y envés de hojas de *Paulownia fortunei* con cloruro de sodio en 15 y 30 días de incubación

	Estomas				Tricomas			
	Haz		Envés		Haz		Envés	
	Días				Días			
NaCl (mM)	15	30	15	30	15	30	15	30
0	0	0	580	620	40	20	20	20
20	0	0	280	500	20	40	20	0
40	0	0	240	180	40	40	20	20
60	0	0	500	520	20	20	20	20
80	0	0	180	140	40	0	20	0
160	0	0	340	340	20	200	20	20

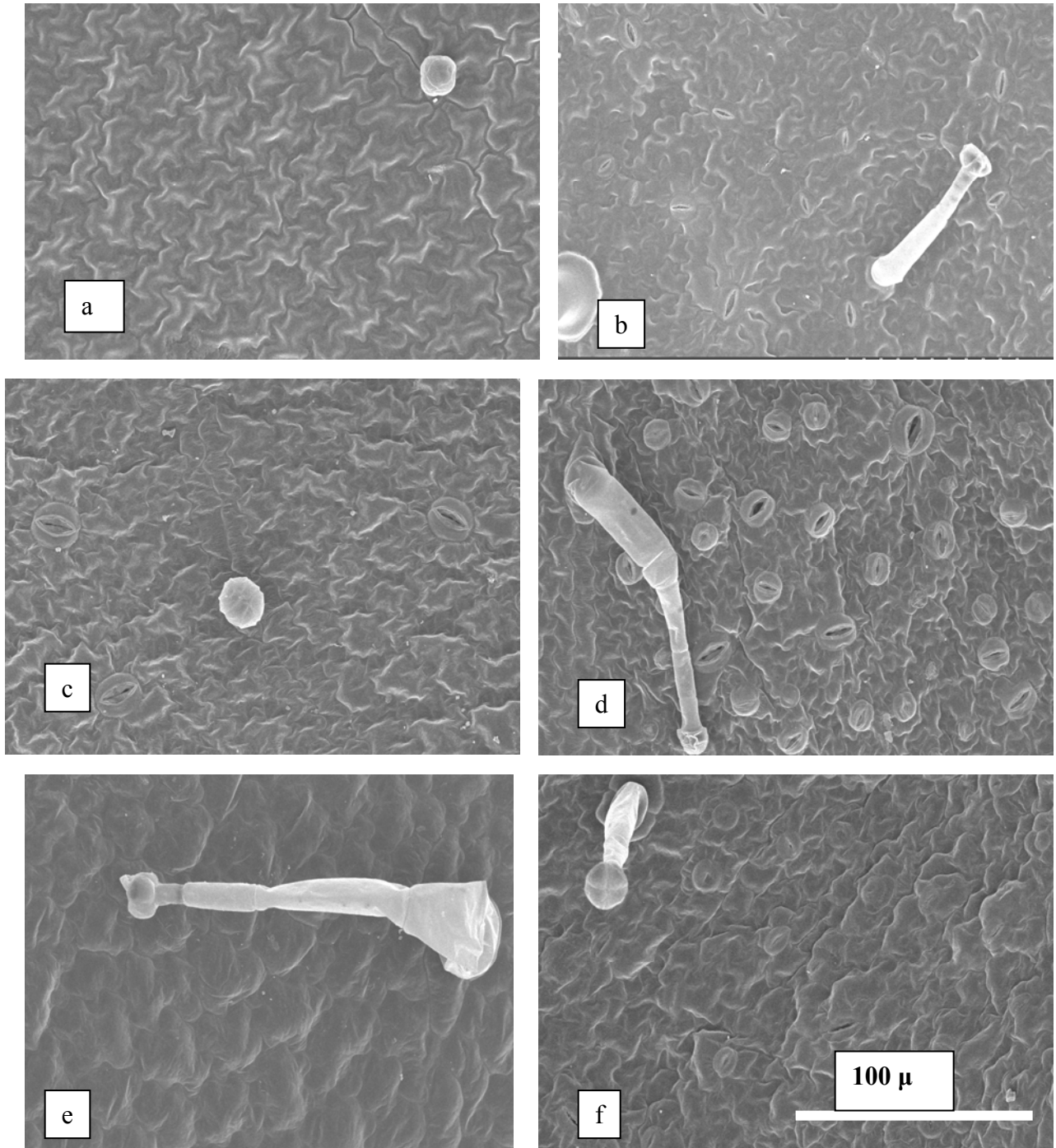


Figura 11. Imagen digital (100 μ) de *P. fortunei* mostrando: a) haz sin sal. b) estomas y tricoma en envés sin sal. c) estomas en haz con 60 mM de NaCl en 30 días. d) estomas y tricoma en envés en 60 mM. e) haz en 160 mM en 30 días. f) Envés en 160 mM en 30 días.

6.2 Respuestas bioquímicas al estrés por cloruro de sodio

6.2.1 Determinación de Pigmentos

Paulownia imperialis

La tabla 5 muestra los pigmentos analizados con el HPLC, como se puede observar, el contenido de clorofila *a* no cambió con 40 mM de cloruro de sodio comparado con el control en *Paulownia imperialis*. Sin embargo, disminuyó significativamente en las concentraciones de 60, 80 y 160 mM de cloruro de sodio, esto se observó en el tiempo de incubación de 15 días, en 30 días de incubación la clorofila *a* disminuyó significativamente en todos los niveles de salinidad, probablemente se debió a que además de incrementarse la concentración de cloruro de sodio, se aumentó el tiempo de incubación y las plantas presentaron necrosis por lo que el contenido de clorofila disminuyó (Tabla 5).

El contenido de clorofila *b* en 15 días no varió con respecto al control en las concentraciones 20 y 40 mM de cloruro de sodio (Tabla 5), mientras que en las concentraciones de 60, 80 y 160 mM de NaCl presentaron una disminución significativa. A los treinta días de incubación la clorofila *b* se redujo significativamente. Di Martino y colaboradores, (2003) trabajando con plantas de espinaca (*Spinacia oleraceae*), encontraron que disminuyó el contenido de clorofila de las hojas en estrés salino. En trigo (*Triticum durum* cv. Gediz-75) el contenido de clorofila disminuyó con 100 mM de NaCl (Tuna *et al.*, 2008).

A los quince días, solo se observó disminución significativa en el contenido de β -caroteno en las concentraciones de 80 y 160 mM de NaCl (Tabla 5), mientras que a los treinta días las muestras que estuvieron sometidas en la concentración menor de cloruro de

sodio (20 mM) fue igual al testigo disminuyendo el contenido de β -caroteno con 60, 80 y 160 mM de cloruro de sodio utilizados. El estrés salino causó reducción del crecimiento y muerte de las plantas y el β -caroteno disminuyó y no funcionó como antioxidante debido al deterioro mostrado por las células y los tejidos de las plantas en las concentraciones de 80 y 160 mM de cloruro de sodio.

El contenido de violaxantina en *P. imperialis* (Tabla 5) se observó igual que el contenido de violaxantina en el control en 40 mM de cloruro de sodio a los quince días, mientras que a los treinta días, se observó una disminución significativa con respecto al testigo en todas las concentraciones de cloruro de sodio indicando que el tiempo de exposición con los niveles de salinidad probados, influyó sobre el contenido de pigmentos en las plantas. Esta disminución del pigmento pudiera ser por su conversión a zeaxantina, como resultado del estrés salino sobre la fotosíntesis y la incapacidad de *Paulownia* de llevar a cabo la fotosíntesis en estos niveles de salinidad y disipar el exceso de energía. En trabajos efectuados con la halófito *Atriplex centralasiatica* con cloruro de sodio de 0 a 400 mM, el contenido de clorofila *a+b* y β -caroteno permanecieron sin variar al incrementarse las concentraciones de cloruro de sodio (Qiu *et al.*, 2003).

Tabla 5. Efecto del cloruro de sodio (mM) sobre pigmentos ($\text{ng}\mu\text{g}^{-1}$) de la parte aérea de *Paulownia imperialis* en 15 y 30 días de incubación

NaCl mM	Clorofila <i>a</i>		Clorofila <i>b</i>		β -caroteno		Violaxantina	
	Días		Días		Días		Días	
	15	30	15	30	15	30	15	30
0	6.45±1.5 a	3.18±0.1 a	1.66±0.3 a	0.90±0.01 a	0.62±0.2ab	0.18±0.02 a	0.34±0.08 a	0.15±0.01a
20	4.76± 1.4 b	1.5±0.9b	1.30±0.3 a	0.46± 0.02b	0.55±0.4ab	0.13± 0.1ab	0.28±0.08b	0.06±0.03b
40	6.14± 0.3ab	1.54±1.3b	1.64± 0.1a	0.47±0.4b	0.74± 0.06 ^a	0.08±0.07bc	0.37±0.04ab	0.06±0.06b
60	2.52± 0.3c	0.57±0.3b	0.75±0.03b	0.25 ±0.04bc	0.25±0.1bc	0.05± .01bc	0.14±0.03c	0.02±0.01b
80	2.27 ±0.5c	0.004±0.001b	0.77±0.1b	0.05± 0.05c	0.24±0.1bc	0.007±0.01 c	0.14±0.02c	0.005±0.004b
160	1.45 ±0.3c	0.68±0.9b	0.45±0.05b	0.0.04±0.04 c	0.19±0.1c	0.027±0.03 c	0.09±0.04c	0.003±0.002b

Las letras muestran diferencias estadísticas ($P<0.05$) entre concentraciones en 15 y 30 días. Media±DS (n=3).

Paulownia fortunei

La Tabla 6 muestra el contenido de los pigmentos analizados en *Paulownia fortunei*. En 15 y 30 días de incubación el contenido de clorofila *a* en el testigo, fue igual que el presentado por las plantas desarrolladas en las concentraciones de 20 y 40 mM de NaCl disminuyendo significativamente con 80 y 160 mM de NaCl a los quince días, mientras que a los treinta días este pigmento disminuyó significativamente con 80 y 160 mM de cloruro de sodio.

El contenido de clorofila *b* se observó igual al presentado por el control en las concentraciones de 20 y 40 mM de cloruro de sodio, disminuyendo significativamente en las concentraciones de 80 y 160 mM de NaCl en 15 días. En 30 días se observó menor contenido de clorofila *b* en todas las muestras con las concentraciones de cloruro de sodio

probadas (Tabla 6). En plantas de fresa encontraron que al aplicar 0, 8.55, 17.10 y 34.21 mM de cloruro de sodio, el contenido de clorofila total no varió (Turhan and Eris, 2005), mientras que en estudios efectuados con pera (*Pisum sativum* L.), el contenido de clorofila disminuyó con 70 mM de NaCl (Hernández *et al.*, 1993) y en trigo (*Triticum durum*) se observó una degradación de clorofila con 150 mM de NaCl (James *et al.*, 2002).

El contenido de β -caroteno en el testigo y de las plantas que estuvieron en concentraciones bajas de NaCl no varió en quince días, mientras que en treinta días, este pigmento disminuyó significativamente con el aumento de la salinidad impuesta (Tabla 6). En experimentos efectuados con álamo (*Populus x canescens*), con 25 y 100 mM de cloruro de sodio, el contenido de carotenoides disminuyó en 20 días (Bolu and Polle, 2004).

El contenido de violaxantina en el testigo fue igual que el presentado por las plantas que se trataron con 40 mM de NaCl en quince días y disminuyó significativamente al incrementarse las concentraciones de cloruro de sodio, a los 30 días de incubación, el contenido de violaxantina disminuyó significativamente al aumentar las concentraciones de NaCl (Tabla 6). En trabajos efectuados con algas encontraron un aumento en los carotenoides al aplicar cloruro de sodio (Masojidek *et al.*, 2000), mientras que en cebada (*Hordeum vulgare* L.) con 20, 60, 120 y 190 mM de NaCl no observaron cambios en los pigmentos (Morales *et al.*, 1992).

Los resultados muestran que al incrementarse el tiempo de exposición de las plantas con las concentraciones de cloruro de sodio utilizados, el contenido de pigmentos

analizados disminuyó en ambas especies, debido a los efectos tóxicos de la salinidad por cloruro de sodio que ocasionó daños en los tejidos.

Cuando las plantas se enfrentan a estrés salino generan especies reactivas de oxígeno (ROS) (Yildirim *et al.*, 2004) que son compuestos tóxicos y dañan a las membranas y macromoléculas. Las plantas han desarrollado estrategias y compuestos antioxidantes para desechar esos compuestos tóxicos. Con el incremento de la defensa antioxidante, las plantas pueden aumentar la tolerancia a factores de estrés. Entre los compuestos antioxidantes están los carotenoides (Wang *et al.*, 2003). Los resultados muestran que los carotenoides disminuyeron con el tratamiento salino por cloruro de sodio en ambas especies de *Paulownia* (Tablas 5 y 6), por lo cual no ejercieron su función antioxidante.

Tabla 6. Efecto del cloruro de sodio (mM) sobre pigmentos ($\text{ng}\mu\text{g}^{-1}$) de la parte aérea de *Paulownia fortunei* en 15 y 30 días de incubación

NaCl (mM)	Clorofila <i>a</i>		Clorofila <i>b</i>		β -caroteno		Violaxantina	
	Días		Días		Días		Días	
	15	30	15	30	15	30	15	30
0	9.30 ±1.9a	2.40±2.0 a	2.62±0.5 a	0.726±0.5 a	0.72±0.04ab	0.14 ±0.1 a	0.48 ±0.1a	0.111±0.09 a
20	8.99± 3.4a	0.10±0.06b	2.49 ±0.9 a	0.056±0.03b	0.76± 0.1a	0.01±0.006b	0.44±0.09ab	0.042±0.002b
40	6.65± 2.5ab	0.9±0.5ab	1.76 ±0.7ab	0.249±0.2b	0.58±0.1 ab	0.06±0.04ab	0.35±0.1ab	0.024±b
60	6.28± 2.1abc	0.05±0.03b	1.68± 0.5abc	0.033±0.1b	0.59±0.2ab	0.006±0.04b	0.32±0.09b	0.002±0.001b
80	3.03±2.1bc	0.07±0.05b	1.31 ±0.4bc	0.033±0.008b	0.50±0.1bc	0.004±0.003b	0.24±0.05bc	0.002±0.001b
160	2.26 ±0.6c	0.03±0.02b	0.6452±0.1 c	0.025±0.01b	0.24±0.07c	0.004±0.003b	0.12±0.01c	0.0008±0.0002b

Las letras muestran diferencias estadísticas ($P<0.05$) entre concentraciones en 15 y 30 días. Media±DS (n=3).

6.2.2 Composición iónica

Paulownia imperialis

Las plantas sometidas a los tratamientos con cloruro de sodio presentaron necrosis a medida que se incrementaron los niveles de salinidad, sin embargo algunas de ellas mostraron formación y crecimiento de nuevos tallos con 20 mM de NaCl. El-Sayed et al, (1995) encontraron que se incrementó la formación de tallos en *P. tomentosa* var. Pallida con 0.86 y 30.8 mM de cloruro de sodio, mientras que con 61.6 y 246.4 mM de NaCl, las plantas mostraron disminución del crecimiento, estos resultados son similares a los resultados obtenidos en el presente estudio. En 30 días la parte aérea de las plantas de *P. imperialis* presentaron necrosis y murieron en los niveles de 80 y 160 mM de NaCl indicando claros síntomas de la toxicidad de los iones (Tester and Davenport, 2003).

Sodio en hojas

El contenido de sodio se incrementó significativamente con respecto al control a medida que se incrementaron los niveles de salinidad, tanto en 15 como en 30 días de incubación (Tabla 7). En estudios efectuados con uva encontraron que la severidad del daño provocado por la sal se incrementó con el aumento de los niveles de salinidad y el tiempo de exposición de los cultivos a la sal (Sivritepe and Eris, 1999).

Potasio en hojas

El contenido de potasio disminuyó comparado con el testigo, con excepción de la concentración de 60 mM de NaCl. En el tiempo de incubación de 30 días, el contenido de potasio disminuyó significativamente, probablemente es el resultado de las interacciones Na:K (Cramer, 2002), estos resultados son diferentes a los reportados con los experimentos efectuados con callos de *Vignia radiate* (L) Wilczek var. Radiate con 300 molm^{-3} de

cloruro de sodio (Kumar and Sharma, 1989), debido a que esta especie es tolerante a altas concentraciones de salinidad.

Calcio en hojas

El contenido de calcio disminuyó significativamente con respecto al control, en ambos tiempos de incubación (Tabla 7), lo cual probablemente se debió a la interacción con iones sodio (Cramer, 2002).

Magnesio en hojas

El contenido de magnesio disminuyó significativamente con respecto al control en ambos tiempos de incubación probados (Tabla 7), lo cual puede deberse al exceso de sodio que causa una disminución en la absorción de otros cationes (Troncoso *et al.*, 1999).

Sodio en tallos

En los tallos de (Tabla 7) se incrementó significativamente el contenido de sodio en 15 y en 30 días de incubación. Se ha reportado que en plantas sometidas a estrés salino, se acumulan iones sodio en sus tejidos (Turhan and Eris, 2007).

Potasio en tallos

El contenido de potasio en los tallos disminuyó significativamente con el aumento en las concentraciones de cloruro de sodio (60, 80 y 160 mM) (Tabla 7), indicando que la salinidad influyó sobre los tallos en los niveles más altos. Para lograr un mejor crecimiento de los vegetales, el potasio debe estar en cantidades adecuadas y en este estudio se observó una reducción en el crecimiento en ambas especies (Figuras 6 y 8), así como una disminución en el peso fresco y el peso seco (Figuras 5 y 7).

Calcio en tallos

Se observó una disminución significativa en el contenido de calcio con el incremento del NaCl (Tabla 7).

Magnesio en tallos

A medida que se incrementaron las concentraciones de cloruro de sodio, disminuyó significativamente el contenido de magnesio en tallos de *P. imperialis* (Tabla 7), estos resultados sugieren que la salinidad altera el transporte de iones afectando el contenido de iones en las plantas (Cramer, 2002) y es similar a los resultados reportados por Tattini (Tattini *et al.*, 1992) al tratar plantas de olivo con diferentes concentraciones de cloruro de sodio (mM), el contenido de potasio, calcio y magnesio disminuyeron con el incremento de los niveles de salinidad.

Sodio en raíces

Con el incremento de la salinidad, se elevó significativamente el contenido de sodio en raíces de *Paulownia imperialis* tanto en 15 como en 30 días (Tabla 7). Las raíces mostraron mayor concentración de sodio que las hojas y tallos. Los medios por los cuales entra el sodio en las plantas no están bien definidos (Flowers, 2004). Wahome (2003), reportó que la acumulación de iones sodio en raíces de *Pistachia* spp mejoró la adaptación de las plantas en estrés salino.

Potasio en raíces

En las concentraciones de 60, 80 y 160 mM de NaCl, se observó una disminución significativa de potasio, sugiriendo que la acumulación de potasio se afectó con concentraciones elevadas de cloruro de sodio. Con niveles adecuados de potasio en las raíces se logra el crecimiento continuo de las plantas (Cramer *et al.*, 1985) y en ambas

especies se redujo el crecimiento (Figuras 5 y 7), comparativamente en plantas de fresa reportaron resultados similares (Turhan and Eris, 2004). En tallos y raíces de sorgo encontraron una disminución en los niveles de potasio, al incrementar la salinidad (Nentondo *et al.*, 2004).

Calcio en raíces

En la Tabla 7 se observa que el contenido de calcio disminuyó significativamente al incrementarse la salinidad.

Magnesio en raíces

El cloruro de sodio indujo una disminución del contenido de magnesio en *Paulownia imperialis*, Turhan and Eris (2004) encontraron en raíces de plantas de fresa, que el contenido de magnesio disminuyó mientras se incrementaron las concentraciones de cloruro de sodio, en estudios efectuados con olivo encontraron resultados similares (Tattini *et al.*, 1992).

Tabla 7. Efecto del cloruro de sodio sobre la composición iónica en hojas, tallos y raíces de *Paulownia imperialis* en 15 y 30 días de incubación

NaCl (mM)	Na ⁺ (%)		K ⁺ (%)		Ca ⁺⁺ (%)		Mg ⁺⁺ (%)		
	Días		Días		Días		Días		
	15	30	15	30	15	30	15	30	
	Hojas								
0	0.12 e	0.1 d	1.51 a	2.22 a	0.60 a	0.54 a	0.17 a	0.16 a	
20	0.54 d	0.59 c	1.39 a	1.48 b	0.18 c	0.20 bc	0.12 ab	0.10 b	
40	1.06 c	0.98 c	1.46 a	1.32 b	0.21 b	0.22 b	0.11 b	0.10 b	
60	1.61 b	2.02 b	0.90 b	1.25 b	0.16 c	0.19 bc	0.09 b	0.09 bc	
80	1.23 c	2.05 b	1.44 ab	1.37 b	0.17 c	0.19 bc	0.07 b	0.08 bc	
160	3.75 a	3.68 a	1.80 a	1.55 b	0.21 b	0.17 c	0.10 b	0.06 c	
	Tallos								
0	0.23 e	0.23 f	3.33 a	3.87 a	0.70 a	0.60 a	0.15 a	0.15 a	
20	0.89 d	0.90 e	2.32 b	3.34 b	0.26 b	0.30 c	0.15 a	0.14 a	
40	1.45 c	1.45 d	2.19 b	2.45 c	0.20 c	0.23 b	0.10 b	0.12 b	
60	2.67 a	3.16 b	1.30 d	1.28 d	0.21 bc	0.22 b	0.10 b	0.11 b	
80	1.38 c	2.63 c	1.32 d	1.70 d	0.18 c	0.21 b	0.10 b	0.11 b	
160	2.25 b	6.83 a	1.77 c	1.57 d	0.20c	0.20 b	0.09 c	0.11 b	
	Raíces								
0	0.26 d	0.35 e	1.77 a	1.78 a	0.38 a	0.36 a	0.12 a	0.10 a	
20	0.88 d	0.84 d	1.79 a	1.79 a	0.10 cd	0.12 c	0.11 ab	0.11 a	
40	2.0 c	1.12 d	1.98 a	1.90 a	0.15 b	0.15 b	0.09 a	0.10 a	
60	3.09 b	1.66 c	1.14 bc	1.21 b	0.13 c	0.12 c	0.08 b	0.06 b	
80	2.48 bc	4.01 b	1.64 ab	1.64 ab	0.15 b	0.13 bc	0.07 bc	0.06 b	
160	5.26 a	9.23 a	0.10 c	1.30 b	0.10 d	0.11 c	0.05 c	0.04 b	

Las letras muestran diferencias estadísticas (P<0.05) entre concentraciones de NaCl en 15 y 30 días. Media±DS (n=3).

Paulownia fortunei

Las plantas de *Paulownia fortunei* en 15 días de incubación, creciendo en 20 mM de NaCl presentaron color verde, tricomas fácilmente visibles en la parte aérea de las plantas, con un promedio de crecimiento de 3 cm. Las plantas con 40 mM de NaCl tuvieron formación de nuevos tallos, los tricomas se podían observar en la parte aérea de las plantas y presentaron un promedio de crecimiento de 2 cm, mientras que las plantas en 60 mM de NaCl, presentaron formación de nuevas raíces con promedio de crecimiento de 1 cm, tricomas visibles en la parte aérea y sus hojas presentaron necrosis. Las hojas de las plantas con 80 mM de NaCl se necrotizaron, sus tallos presentaron formación de nuevos brotes. Las hojas, tallos y raíces de las plantas que estuvieron en la concentración de 160 mM de NaCl, presentaron necrosis y finalmente murieron. En experimentos efectuados con papa (Mahmood and Raziuddin, 2002) con 0, 170, 340, 510 y 680 mM de NaCl, se observó una disminución gradual en el tamaño de las plantas de papa con el incremento en los niveles de cloruro de sodio, en 680 mM de sal las plantas no lograron sobrevivir.

Sodio en hojas

La Tabla 8 muestra que el contenido de sodio aumentó significativamente con respecto al control en hojas de *P. fortunei* en 15 y 30 días de incubación.

Potasio en hojas

El contenido de potasio disminuyó significativamente con el incremento de los niveles de NaCl utilizados (Tabla 8), contrario a estos resultados, en plantas de espinacas encontraron que el contenido de sodio no varió significativamente y la concentración de potasio no disminuyó significativamente (Di Martino *et al.*, 2003).

Calcio en hojas

El contenido de calcio en *P. fortunei* disminuyó significativamente al incrementarse la salinidad (Tabla 8).

Magnesio en hojas

El contenido de magnesio no presentó diferencias significativas en 15 días de incubación. En experimentos efectuados con plantas de tomate al someterlas en estrés de sal no presentaron diferencias significativas en el contenido de sodio, potasio, calcio y magnesio (Del Amor et al, 2001). El contenido de magnesio en *P. fortunei* disminuyó significativamente en 30 días de incubación (Tabla 8).

Sodio en tallos

Los tallos de *P. fortunei* presentaron un aumento significativo en el contenido de sodio en las concentraciones de cloruro de sodio probadas en ambos tiempos de incubación

Potasio en tallos

El contenido de potasio disminuyó significativamente (Tabla 8) con el incremento de las concentraciones de cloruro de sodio.

Calcio en tallos

El contenido de calcio disminuyó significativamente con las concentraciones de NaCl utilizadas. En 30 días de incubación en 20 mM de NaCl presentó el valor más alto (Tabla 8). En experimentos efectuados con arroz, presentaron resultados similares (Yamamoto *et al.*, 2003).

Magnesio en tallos

El contenido de magnesio en la concentración de 160 mM de NaCl no mostró diferencias comparado con el control tanto en 15 como en 30 días de incubación, mientras que en 15 días de incubación, en el nivel de salinidad de 80 mM de NaCl presentó el más alto valor y en 30 días, el valor más alto lo presentó en la concentración de 20 mM de cloruro de sodio (Tabla 8). En experimentos efectuados con vid, el contenido de magnesio disminuyó significativamente con 100 mM de NaCl mientras que en 150 mM de NaCl se incrementó con respecto al testigo (García and Charbaji, 1993).

Sodio en raíces

Las raíces presentaron un incremento significativo en el contenido de sodio en 15 y en 30 días de incubación (Tabla 8), resultados similares se han reportado con tomate en condiciones salinas (Cuartero y Fernández, 2003).

Potasio en raíces

El contenido de potasio en 15 días de incubación disminuyó significativamente en el nivel más alto de cloruro de sodio probado, mientras que se incrementó en las concentraciones menores de NaCl (20 y 40 mM). En 30 días de incubación, el potasio se incrementó en las plantas que estuvieron en 20 mM de cloruro de sodio y permaneció igual al incrementarse los niveles de salinidad (Tabla 8).

Calcio en raíces

El contenido de calcio disminuyó significativamente en 15 días de incubación, mientras que en 30 días presentó alto porcentaje en 20 mM de cloruro de sodio.

Magnesio en raíces

En las concentraciones utilizadas de cloruro de sodio en 15 días, las raíces permitieron la entrada de magnesio, mostrando cantidades similares al control (Tabla 8), en

30 días el contenido de magnesio disminuyó significativamente en los niveles de 40 a 160 mM de NaCl. En experimentos efectuados con uva el contenido de magnesio disminuyó significativamente con 100 mM de cloruro de sodio y con 150 mM se presentó un incremento en magnesio con respecto al control (García and Charbaji, 1993). El desequilibrio nutrimental ocasionado por la toxicidad por sales afecta la absorción y transporte de iones como potasio, calcio y magnesio entre otros (Munns, 2002), lo cual se puede observar en los resultados obtenidos en ambas especies de Paulownia.

Tabla 8. Efecto de cloruro de sodio (mM) sobre la composición iónica de hojas, tallos y raíces de *Paulownia fortunei* en 15 y 30 días en incubación

NaCl (mM)	Na ⁺ (%)		K ⁺ (%)		Ca ⁺⁺ (%)		Mg ⁺⁺ (%)	
	Días		Días		Días		Días	
	15	30	15	30	15	30	15	30
	Hojas							
0	0.13 c	0.30 c	3.01 a	2.69 a	0.50 a	0.18 b	0.16 a	0.11 a
20	0.74 bc	0.60 c	2.89 a	2.29 a	0.17 b	0.18 b	0.16 a	0.09 a
40	0.93 bc	0.88 bc	1.83 b	1.75 b	0.18 b	0.19 b	0.13 a	0.12 a
60	1.76 ab	2.85 a	2.05 b	1.58 b	0.21 b	0.16 b	0.11 a	0.08 a
80	2.25 a	1.50 b	1.90 b	2.03 ab	0.16 b	0.28 a	0.13 a	0.12 a
160	2.30 a	3.30 a	2.63 ab	1.65 b	0.16 b	0.18 b	0.14 a	0.07 a
	Tallos							
0	0.27 c	0.14 e	5.24 a	4.27 a	0.71 a	0.28 ab	0.13 c	0.09 b
20	0.56 c	0.45 e	3.95 bc	4.55 a	0.25 b	0.39 ab	0.20 b	0.12 a
40	1.90 bc	1.39 d	3.41 bc	2.50 b	0.25 b	0.26 ab	0.17 cd	0.11 ab
60	2.55 b	2.18 c	2.52 c	1.93 b	0.23 bc	0.29 ab	0.17 cd	0.10 ab
80	1.67 bc	2.77 b	3.21 c	2.36 b	0.28 b	0.18 b	0.27 a	0.06 c
160	7.93 a	4.20 a	2.79 c	2.05 b	0.16 c	0.19 b	0.12 d	0.09 b
	Raíces							
0	0.16 d	0.17 f	2.38 b	2.42 b	0.36 a	0.12 b	0.15 b	0.09 c
20	0.49 d	1.15 e	3.48 a	3.40 a	0.12 b	0.17 a	0.17 b	0.16 a
40	1.19 c	1.59 de	3.51 a	2.47 b	0.14 b	0.11 b	0.18 ab	0.11 b
60	1.93 b	2.17 cd	1.95 bc	2.26 b	0.12 b	0.13 b	0.13 b	0.09 c
80	1.70 b	2.34 bc	2.42 bc	2.57 b	0.13 b	0.09 c	0.14 b	0.05 d
160	3.43 a	3.07a	1.80 c	2.42 b	0.11 b	0.11 bc	0.10 bc	0.05 d

Las letras muestran una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre concentraciones de NaCl en 15 y 30 días. Media \pm DS (n=3).

6.2.3 Relación (K^+/Na^+)

En raíces, tallos y hojas de ambas especies, al incrementarse los niveles de salinidad se disminuyó la relación K^+/Na^+ en 15 y 30 días (Tabla 9). *Paulownia fortunei* en todos los órganos presentó niveles más elevados de la relación K^+/Na^+ que los mostrados por *Paulownia imperialis*. El incremento en los iones sodio y la disminución en el contenido de los iones potasio, así como la relación K^+/Na^+ , se puede deber a la competencia entre los iones sodio y potasio con los sitios de absorción en las raíces de las plantas (Bhivare and Nimbalkar, 1984). La capacidad de las plantas para mantener alta la relación K^+/Na^+ , en el citosol, es importante para la tolerancia a la sal (Maathuis and Amtmann, 1999).

Tabla 9. Relación K^+/Na^+ de *Paulownia imperialis* y *Paulownia fortunei* en los niveles de salinidad

NaCl (mM)	<i>P. imperialis</i>		<i>P. fortunei</i>		
	Hojas				
Días	15	30	15	30	
0	12.58	22.20	23.15	8.97	
20	2.57	2.51	3.91	3.92	
40	1.38	1.35	1.97	1.99	
60	0.56	0.62	1.16	0.55	
80	1.09	0.67	0.84	1.35	
160	0.48	0.42	1.14	0.50	
	Tallos				
0	14.48	14.43	19.41	30.50	
20	2.61	3.41	7.05	10.11	
40	1.51	1.48	1.79	1.80	
60	0.49	0.41	0.99	0.87	
80	0.96	0.65	1.92	0.86	
160	0.79	0.23	0.35	0.49	
	Raíces				
0	6.81	5.09	15.69	14.24	
20	2.03	2.13	7.12	2.96	
40	0.99	1.70	2.95	1.55	
60	0.37	0.73	1.01	1.04	
80	0.66	0.41	1.43	1.10	
160	0.02	0.14	0.64	0.79	

6.2.4 Determinación de proteínas

Paulownia imperialis

La Tabla 10 muestra el contenido de proteínas en 15 días de incubación, observándose que en 20 mM de cloruro de sodio el contenido de proteína fue más alta que el contenido de proteínas en el control, mientras que el contenido de proteínas determinada en el control fue la misma que la presentada por las plantas que estuvieron en las concentraciones de 40, 60 y 80 mM de cloruro de sodio y disminuyó significativamente en la concentración mas elevada de NaCl (160mM). Munns (2002), mencionó que la toxicidad por sales causa disminución en la síntesis de proteínas. En 30 días, el contenido de proteínas fue muy similar en los niveles de 40 y 60 mM de NaCl y no presentaron diferencias significativas con respecto al testigo, mostrando el valor más alto con 160 mM de NaCl. El incremento en los niveles de proteína en plantas con estrés salino, puede significar que la salinidad promueva la fijación de nitrógeno orgánico con lo cual se favorece la síntesis de proteínas.

Paulownia fortunei

En la Tabla 10 se muestra que las concentraciones más elevadas de proteínas solubles se presentaron en las plantas que estuvieron sometidas en las concentraciones más altas de cloruro de sodio (80 y 160 mM), mientras que con 20 mM de cloruro de sodio se observaron concentraciones de proteínas solubles similares a las encontradas en el testigo. En 30 días de incubación las concentraciones más altas de proteínas solubles se presentaron cuando las plantas estuvieron en los niveles más elevados de salinidad, el control presentó resultados similares que los presentados por las plantas que estuvieron en las

concentraciones de 40, 60 y 80 mM de NaCl, mientras que en la concentración de 20 mM de NaCl se encontró el menor contenido de proteínas. En investigaciones con *Vigna unguiculata* (L) Walp. Cultivar Vita 5, al someterla a estrés salino el contenido de proteínas solubles no varió con respecto al control, mientras que en tallo presentó un incremento significativo con 100 mM de cloruro de sodio (Franco *et al.*, 1999).

Tabla 10. Efecto del cloruro de sodio (mM) sobre proteínas (mgL⁻¹) en *Paulownia imperialis* y *Paulownia fortunei* en 15 y 30 días

NaCl (mM)	<i>Paulownia imperialis</i>		<i>Paulownia fortunei</i>	
	Días		Días	
	15	30	15	30
0	1.075±0b	0.109±0.01b	0.350±0 b	0.109±0.01c
20	1.439±0a	0.182±0 a	0.53±0.26 b	0.076±0.01d
40	1.196±0.2b	0.109±0.01b	1.196±0.21 c	0.134±0.01c
60	1.075±0b	0.096±0.02bc	0.712±0 b	0.114±0.01c
80	1.075±0b	0.076±0.01c	2.16±0 a	0.153± 0 abc
160	0.591±0.2c	0.172±0.01 a	1.80±0.51 a	0.172±0.01 a

Las letras muestran diferencias estadísticas (P<0.05) entre concentraciones en 15 y 30 días. Media±DS (n=3).

6.2.5 Determinación de Peroxidasas

La Tabla 11 muestra la actividad específica de peroxidasas en *P. imperialis* y *P. fortunei* en 30 días de incubación, se puede observar que en ambas especies la actividad específica de peroxidasas no varió en las concentraciones de NaCl probadas. El-baky y colaboradores (2003), en experimentos con cebolla (*Allium cepa* L.) encontraron que la actividad de peroxidasas se incrementó al aumentar las concentraciones de salinidad, en un

trabajo reportado con frijol yorimón (*Vigna unguiculata* (L) Walp) se observó incremento en peroxidasas con 200 mM de cloruro de sodio (Cavalcanti et al., 2004). Los resultados de este estudio, muestran que en el tiempo en que se determinó la enzima (30 días), su actividad había declinado.

Tabla 11. Efecto del cloruro de sodio sobre la actividad específica de peroxidasas (Umgproteína⁻¹) de *Paulownia imperialis* y *Paulownia fortunei* en 30 días

NaCl (mM)	<i>Paulownia imperialis</i>	<i>Paulownia fortunei</i>
0	0.003±0.001 a	0.0016±0.0003 a
20	0.0065±0.00 a	0.0746±0.011 a
40	0.004±0.002 a	0.0022±0.001 a
60	0.0061±0.005 a	0.00067±0.0002 a
80	0.005±0.002 a	0.0028±0.0002 a
160	0.0059±0.001 a	0.0063±0.0001 a

Las letras muestran diferencias estadísticas (P<0.05) entre concentraciones de NaCl en 15 y 30 días de incubación. Media±DS (n=3).

6.2.6 Determinación de TBARS (Peroxidación de lípidos)

La prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA) se utilizó para determinar (Malonaldehído) MDA, como un producto final en la peroxidación de lípidos. La Tabla 12 muestra que en 15 días de incubación en *P. imperialis* el contenido de TBARS, se incrementó significativamente a medida que aumentaron los niveles de salinidad, las plantas testigo y las plantas que estuvieron en 40 mM de NaCl presentaron resultados

similares; con 60 y 160 mM de NaCl se incrementó significativamente, estos niveles de peroxidación de lípidos puede ser el resultado del estrés osmótico (prolina se incrementó) (Figura 12), causando una reducción en la conductividad estomática (Tabla 15). Comparativamente en plantas de frijol yorimón (*Vigna unguiculata*) (H) Walp, se observó un aumento en TBARS con 200 mM de NaCl (Cavalcanti et al., 2004). En 30 días de incubación el testigo presentó el valor más alto, disminuyendo significativamente a medida que se incrementaron las concentraciones de cloruro de sodio, lo cual indica daños a los tejidos por los iones tóxicos.

En *P. fortunei* el contenido de TBARS en las plantas control y en las plantas que estuvieron con 20 mM de cloruro de sodio no presentó diferencias significativas, mientras que con 60 mM de NaCl, se observó el valor más alto de TBARS y disminuyó significativamente a medida que se incrementaron los niveles de cloruro de sodio en 15 días de incubación. En 30 días de tratamiento, el contenido de TBARS aumentó significativamente con 20 mM de NaCl disminuyendo significativamente en todos los niveles de cloruro de sodio utilizados (Tabla 12), comparando estos resultados en experimentos realizados con cebolla (*Allium cepa* L.) reportaron resultados contrarios a los obtenidos en el presente estudio, donde el contenido de TBARS se incrementó con las concentraciones altas de sal (El-baky et al., 2003), como en *P. imperialis*, lo que indica que los tejidos de *P. fortunei*, son más sensibles al incremento del cloruro de sodio, por lo cual el contenido de TBARS disminuyó.

Tabla 12. Efecto del cloruro de sodio sobre TBAR (nmolTBARSmg de proteína⁻¹) en *Paulownia imperialis* y *Paulownia fortunei* en 15 y 30 días

NaCl (mM)	<i>Paulownia imperialis</i>		<i>Paulownia fortunei</i>	
	15	30	15	30
0	359.7±34.1c	9407.58±959.52 a	5787.97±530.67b	20270.08±2380.7b
20	924.25±69.49b	5676.98±660.18 b	4925.33±2197.92b	36674.24±7443.71a
40	581.61±188.72bc	2830.83±1383.68 c	3497.01±652.73bc	7970.78±2735.98cd
60	3683.7±604.22 a	3980.91±2408.76bc	9805.7±4189.36a	11957.89±2230.53c
80	1252.71±51.23b	4209.09±1429.57bc	1163.58±78.88c	3688.68±587.05d
160	3703.2±260.62 a	2340.64±215.74 c	41.96±24.47c	3855.37±617.08d

Las letras muestran diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre concentraciones en 15 y 30 días. Media±DS (n=3).

6.2.7 Determinación de catalasa

Como se puede observar en la Tabla 13, no hubo diferencias significativas en la actividad de catalasa en *P. imperialis* en 30 días de incubación, mientras que en *P. fortunei*, la actividad de la enzima disminuyó significativamente en 160 mM de NaCl con respecto al control. En plantas de frijol yorimón (*Vigna unguiculata* (L) Walp) se observó que la actividad de catalasa disminuyó con 200 mM de NaCl (Cavalcanti *et al.*, 2004), así como

en mulberry (*Morus* sp.) cultivar pei con 100 y 150 mM de NaCl (Harinasut *et al.*, 2003). Se ha visto que el estrés salino causó una disminución en la actividad de catalasa en pera (*Pisum sativum*) y arroz (*Oriza sativa*) mientras que en otras plantas se incrementó la actividad de esta enzima como en *Cicer arietinum* (El-baky *et al.*, 2003). En el presente trabajo no se detectaron diferencias significativas debido a que posiblemente en ese tiempo (30 días), la enzima ya había presentado su máxima actividad ó tal vez no ejerció función antioxidante para detoxificar a las especies reactivas de oxígeno.

Tabla 13. Efecto del cloruro de sodio sobre la actividad de catalasa (Umg de proteína⁻¹) en *Paulownia imperialis* y *Paulownia fortunei* en 30 días de incubación

NaCl (mM)	<i>Paulownia imperialis</i>	<i>Paulownia fortunei</i>
0	0.175±0.1 a	0.1±0.01 ab
20	0.17±0.05 a	0.2±0.1 a
40	0.11±0.08 a	0.09±0.01 b
60	0.15±0.04 a	0.13±0.01 ab
80	0.223±0.06 a	0.13±0.02 ab
160	0.2±0.1 a	0.06±0.04 b

Las letras muestran diferencias estadísticas (P<0.05) entre concentraciones en 15 y 30 días. Media±DS (n=3).

6.2.8 Determinación de Prolina

En *Paulownia imperialis* los resultados muestran un aumento en los niveles de prolina al incrementarse las concentraciones de cloruro de sodio con respecto al control, con 20 y 40 mM de NaCl, alcanzando su valor mayor en esta última concentración de cloruro de sodio, después disminuyó significativamente con 60, 80 y 160 mM de NaCl (Figura 12). En experimentos con arroz (*Oriz sativa*) con sensibilidad al estrés salino, el contenido de prolina en hojas se incrementó con 50 mM de NaCl y disminuyó con 100 mM de NaCl (Lutts *et al.*, 1999). Esta disminución de prolina en las concentraciones altas de cloruro de sodio, significa que no interviene como compuesto osmoprotector. Tal y colaboradores (1979) mencionaron que la acumulación de prolina durante el estrés corresponde a dos funciones principales: Que prolina puede ser la principal fuente de energía y de nitrógeno durante el metabolismo después del estrés y que puede actuar como un regulador osmótico durante el estrés salino. Se esperaría un incremento de prolina como un soluto compatible en condiciones salinas, en la figura 12, se observa que en *P. imperialis* este aminoácido se incrementó en 60 mM de NaCl, con lo cual se esperaría que la planta esté desarrollando una respuesta al estrés, sin embargo, el contenido de prolina disminuyó significativamente en los niveles elevados de cloruro de sodio (80 y 160 mM).

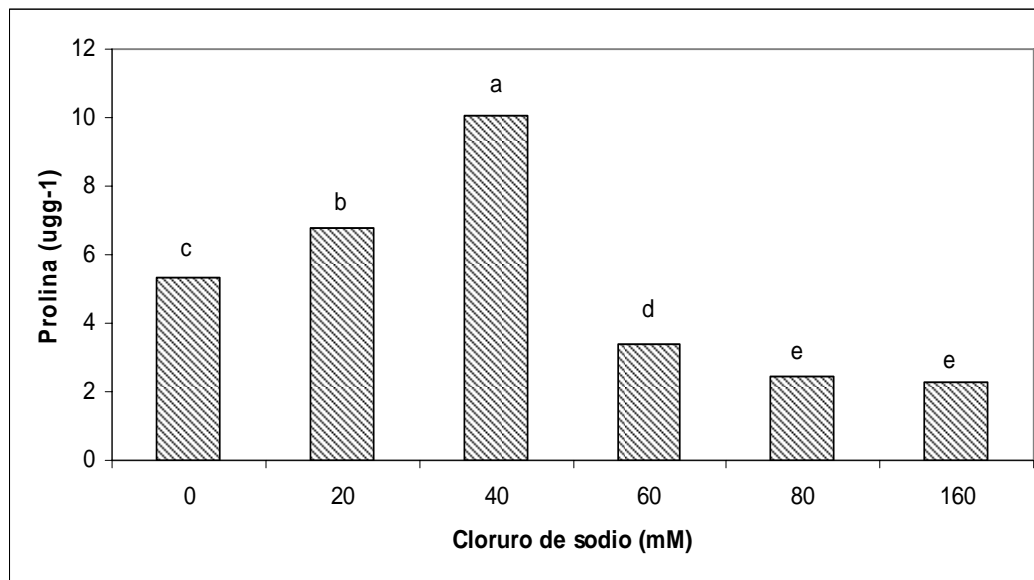


Figura 12. Efecto del cloruro de sodio (mM) sobre prolina ($\mu\text{g g}^{-1}$) en *P. imperialis* en 30 días. Valores no asociados con la misma letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Contrario a *P. imperialis*, en *P. fortunei* el contenido de prolina disminuyó significativamente a medida que se incrementaron las concentraciones de NaCl, observándose alto nivel en 60 de NaCl, disminuyendo en la concentración de 80 mM para volver a incrementar en 160 mM (Figura 12), mostrando diferencias significativas con respecto al control en todos los niveles de salinidad. Esta disminución de prolina significa que no interviene como compuesto osmoprotector en las condiciones de salinidad por cloruro de sodio probadas, ya que se esperaría el incremento de este aminoácido para funcionar como compuesto osmoprotector en *Paulownia* en condiciones de salinidad (Bohnert *et al.*, 1995; Rathinasabapathi, 2000; Tester and Davenport, 2003). En

experimentos efectuados con remolacha azucarera en diferentes concentraciones de cloruro de sodio, encontraron resultados similares (Gzik, 1996). En ensayos llevados a cabo con *Quercus rugosa*, la prolina se incrementó al incrementarse las concentraciones de cloruro de sodio (Zamacona y Moreno, 2005). Dracup (1991) mencionó que los niveles de prolina se incrementan al aumentar las concentraciones de sal. La acumulación de prolina en los tejidos de las plantas, se atribuye a que se incrementa su síntesis y disminuye su degradación debido al estrés salino (Kishor *et al.*, 2005). En experimentos con diferentes variedades de sorgo (*Sorghum bicolor*) mostraron que la prolina no se relacionó con la tolerancia al estrés salino (Caplan *et al.*, 1990), mientras que con arroz (*Oriza sativa* L.) la prolina contribuyó a inhibir el crecimiento y a la disminución de clorofila en condiciones de salinidad (García *et al.*, 1997).

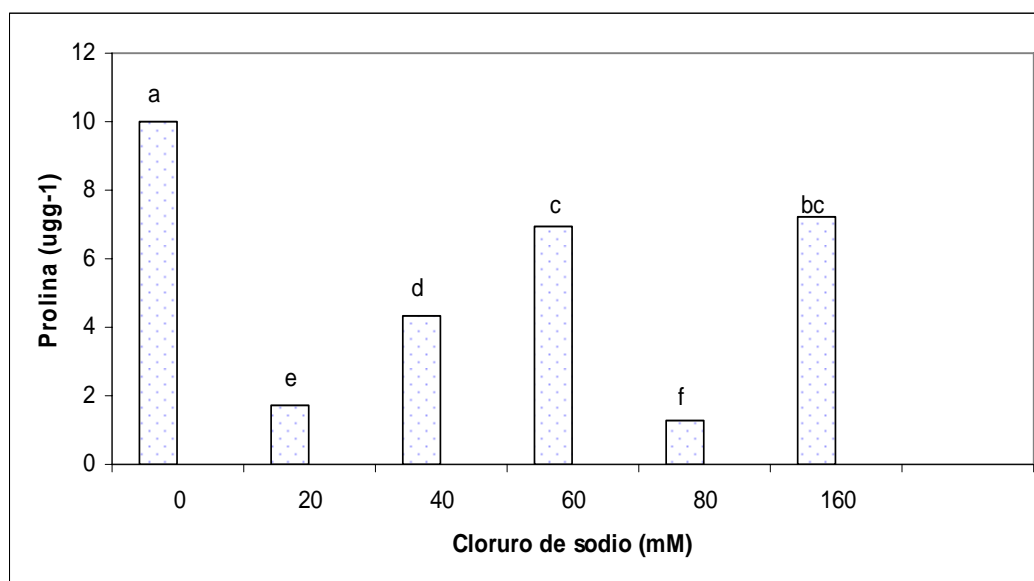


Figura 13. Efecto del cloruro de sodio (mM) sobre prolina ($\mu\text{g g}^{-1}$) en *P. fortunei* en 30 días. Valores no asociados con la misma letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

6.3 Respuestas fisiológicas al estrés por cloruro de sodio

6.3.1 Fotosíntesis en *Paulownia imperialis*

En la tabla 14 se observa que la fotosíntesis a los 19 días de incubación fue mayor en las plantas control que en las plantas que estuvieron sometidas en las condiciones de salinidad y a medida que se incrementó la concentración de NaCl la fotosíntesis disminuyó significativamente. Por otra parte, a los 26 días de incubación, se observó disminución significativa a partir de los tratamientos de 40 mM y en el tratamiento con 160 mM. Se ha reportado que la salinidad influye sobre la fotosíntesis (Kozłowski, 1997). Longstreth y Nobel (1979) mencionaron que la salinidad puede afectar la fotosíntesis a nivel de estomas, dependiendo del tipo de salinidad, duración del tratamiento, especies y de la edad de la planta. El efecto de la salinidad en las plantas, es compleja, en niveles bajos o elevados, en ocasiones se incrementa el rendimiento de la tasa fotosintética. Con salinidad media o alta la fotosíntesis en la hoja es severamente inhibida, una posible razón de esta disminución en la fotosíntesis inducida por la sal podría ser la reducción en el contenido de clorofila, la cual está asociada a la clorosis en hojas (Shabala *et al.*, 2005).

6.3.2 Respiración en *Paulownia imperialis*

Con respecto a la respiración, en la tabla 14 se observa que a los 26 días en hubo diferencias significativas; los niveles de 20 y 60 mM de NaCl fueron estadísticamente iguales y los niveles de 0, 40 y 80 fueron iguales entre ellos y diferentes significativamente con los valores observados en 20 y 60 mM de cloruro de sodio.

6.3.3 Transpiración en *Paulownia imperialis*

La tabla 14 muestra los resultados de la transpiración en *P. imperialis* tratada con diferentes concentraciones de cloruro de sodio a los 19 y 26 días, no se observaron diferencias significativas. Robinson *et al.* (1997) mencionaron que tanto en plantas halófitas como en las plantas no halófitas, la transpiración generalmente tiende a declinar al incrementarse la salinidad, lo cual no se observó en los resultados obtenidos con *Paulownia imperialis* en ambos períodos de tiempos (Tabla 14). En experimentos efectuados con (*Pinus banksiana* Lamb.) la transpiración se redujo con el incremento de la salinidad por cloruro de sodio (Franklin and Zwiazek, 2004) y en arroz (*Oriza sativa*) la transpiración se redujo con 75 y 150 mM de NaCl (Moradi and Ismail, 2007) y en frijol yorimón (*Vigna unguiculata* (L) Walp) con 200 mM de cloruro de sodio (Cavalcanti et al., 2004).

Tabla 14. Efecto del cloruro de sodio (mM) sobre la Fotosíntesis, Respiración y Transpiración en *Paulownia imperialis*

	Fotosíntesis ($\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)		Respiración ($\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Transpiración ($\text{molH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$)	
	19	26	26	19	26
NaCl (mM)					
0	5.21±1.39 a	5.14±1.09 a	-3.16±0.61 b	4.28±1.66 a	1.75±0.58 a
20	4.77±0.83 a	8.45±1.23 a	-5.38±0.42 a	3.12±1.32 a	1.91±0.17 a
40	1.51±0.6 b	4.26±3.88 b	-2.43±0.87 b	4.54±1.2 a	1.9±0.75 a
60	-3.16±1.49 b	5.37±0.89 ab	-2.67±0.02 a	3.5±2.10 a	1.72±0.74 a
80	-0.13*	2.89±1.07 b	-2.95±0.87 b	4.67*	1.72±0.45 a
160	-3.8±2.00 b	-10.96*	-2.78*	4.74±3.5 a	3.48*

* Es solamente un dato

Las letras muestran diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre concentraciones de NaCl en 19 y 26 días. Media±ES (n=3).

6.3.4 Conductancia estomática en *Paulownia imperialis*

En la tabla 15 se presentan los resultados de la conductancia estomática en 19 días de incubación, donde se observa que en el análisis estadístico muestran que no hay diferencia significativa en *P. imperialis*.

La conductancia estomática en *P. imperialis* en 26 días de incubación, se observa que disminuyó significativamente en 40 mM de cloruro de sodio, mientras que con 60 mM de NaCl se incrementó significativamente y después volvió a disminuir significativamente en 80 mM (Tabla 15). La disminución en la conductancia estomática podría ser porque al

incrementarse los niveles de salinidad se desencadena un déficit hídrico, el cual induce al aumento de ABA (ácido abscísico), el cual causa el cierre estomático. En experimentos efectuados con tomate (*Lycopersicon esculentum*) variedades Daniela y Moneymarker, la conductancia estomática se redujo significativamente con 35 mM de cloruro de sodio (Goykovic, 2007) y en trigo (*Triticum durum*) con 150 mM de cloruro de sodio disminuyó la conductancia estomática debido a la concentraciones de los iones tóxicos en hojas (James *et al.*, 2002)

Tabla 15. Efecto del cloruro de sodio (mM) sobre la Conductancia estomática ($\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$) en *Paulownia imperialis*

Días	Conductancia estomática ($\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$)	
	19 días	26 días
NaCl (mM)		
0	184.74±159.4 a	54.09±19.98 ab
20	130.022±67.56 a	45.93±6.96 ab
40	241.98±106.84 a	27.78±8.27 b
60	105.41±94.18 a	127.08±70.4 a
80	207.424*	38.57±15.57 b
160	204.67±214.3 a	368.799*

*Es solamente un dato

Las letras muestran diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre concentraciones de cloruro de sodio en 19 y 26 días. Media±ES (n=3).

6.3.5 WUE (A/E) en *Paulownia imperialis*

En la tabla 16 se muestra el efecto del cloruro de sodio en las concentraciones utilizadas en el presente estudio sobre la tasa instantánea de eficiencia de uso de agua (WUE) a los 19 días en *P. imperialis*, se observa que no hubo diferencias significativas en el tratamiento de 20 mM de cloruro de sodio con respecto al control, mientras que con el incremento de las concentraciones de cloruro de sodio, WUE disminuyó significativamente.

A los 26 días, el promedio de la tasa instantánea de eficiencia de uso de agua (fotosíntesis /respiración) disminuyó al incrementarse los niveles de salinidad, sin embargo estos resultados no fueron estadísticamente significativos (Tabla 16), puede ser porque la fotosíntesis se inhibió (Tabla 14).

6.3.6 CO₂ interno sobre CO₂ externo (Ci/Ca) en *P. imperialis*

En 19 días en el nivel menor de salinidad (20 mM) se observó una disminución significativa del CO₂ interno sobre CO₂ externo (Ci/Ca), mostrando un comportamiento estadísticamente igual en los otros niveles de salinidad (Tabla 16), el nivel más alto lo presentó con 60 mM de NaCl.

En 26 días el valor más alto de Ci/Ca, lo presentó el nivel de 60 mM de NaCl disminuyendo estadísticamente en el control y en 20, 40 y 160 mM de cloruro de soio (Tabla 16). En experimentos efectuados con trigo (*Triticum durum*) con 75 y 150 mM de cloruro de sodio se redujo el CO₂ interno (James *et al.*, 2002).

Tabla 16. Efecto del cloruro de sodio (mM) sobre WUE y Ci/Ca en *Paulownia imperialis* en 19 y 26 días

Días	WUE (A/E)		Ci/Ca	
	19 días	26 días	19 días	26 días
NaCl (mM)				
0	1.31±0.19 a	5.26±1.78 a	0.92±0.011 ab	0.82±0.03 b
20	1.98±0.91 a	4.49±0.91 a	0.91±0.009 b	0.85±0.01 b
40	0.17±0.36 ab	2.85±2.09 a	0.95±0.018 ab	0.87±0.3 ab
60	-0.53±0.15 b	3.36±1.91 a	0.96±0.030 a	0.90±0.01 a
80	-0.027*	2.05±1.04 a	0.96*	0.90±0.01 ab
160	-0.89±0.24 b	-1.41*	0.95±0.025 ab	0.9927*

* Es solamente un dato

Las letras muestran diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre concentraciones de cloruro de sodio en 19 y 26 días. Media±ES (n=3).

6.3.7 Fotosíntesis en *Paulownia fortunei*

En 19 días se puede notar que en los niveles de 20, 40, 60 y 80 mM de cloruro de sodio no hay diferencias significativas en la fotosíntesis (Tabla 17) y que existe una disminución significativa en la concentración de 160 mM de NaCl con respecto al testigo, se ha visto que la toxicidad por sales causa una reducción en la fotosíntesis (Munns, 2002). En 26 días de incubación la fotosíntesis disminuyó significativamente con 40 mM de cloruro de sodio para incrementarse significativamente en 60 mM de NaCl. No se obtuvieron resultados con 80 y 160 mM de NaCl porque las plantas murieron. En experimentos efectuados con *Scirpus* la fotosíntesis se inhibió en la concentración de 150 mM de cloruro de sodio (Percy and Ustin, 1984), mientras que con arroz (*Oriza sativa*) se disminuyó la fotosíntesis con 75 y 150 mM de NaCl (Moradi and Ismail, 2007). El

contenido de clorofila es un indicador del proceso de fotosíntesis y el hecho de que en *P. imperialis* y *P. fortunei* haya disminuido la clorofila (Tablas 7 y 8) al incrementarse la salinidad, demuestra que la fotosíntesis se inhibió por el aumento de la salinidad (Cowan *et al.*, 1992), hay disminución de biomasa (peso fresco y peso seco) (Figuras 5 y 7), de carotenoides (Tablas 7 y 8) (Amotz and Avron, 1997). La estabilidad de la clorofila es un indicador de la capacidad de las plantas a la tolerancia al estrés y su disminución en ambas especies de *Paulownia* indica que no son tolerantes al estrés por cloruro de sodio.

6.3.8 Respiración en *Paulownia fortunei*

En la tabla 17 se puede observar que en la respiración no presentaron diferencias significativas en las condiciones de salinidad efectuadas en el presente estudio.

6.3.9 Transpiración en *Paulownia fortunei*

En la Tabla 17, se observa que la transpiración en *P. fortunei* es estadísticamente igual al testigo en 19 días de incubación en todas las concentraciones de cloruro de sodio probadas, Robinson *et al.*, (1997) mencionaron que tanto en plantas halófitas como en las plantas no halófitas, la transpiración generalmente tiende a declinar al incrementarse la salinidad, lo cual puede deberse a que el potencial hídrico disminuyó en las raíces, sin embargo los resultados con *P. imperialis* en ambos tiempos de incubación, así como *P. fortunei* en 19 días no mostraron variación significativa, únicamente los resultados obtenidos con *P. fortunei* en 26 días, en donde se observó un incremento significativo con 40 mM de cloruro de sodio en la transpiración para disminuir significativamente en 0, 20, y 60 mM de NaCl de acuerdo a Robinson *et al.*, (1997). En experimentos efectuados con fresa

(variedad Camarosa), la transpiración se redujo con 8.55, 17.10 y 34.21 mM de NaCl (Turhan and Eris, 2007).

Tabla 17. Efecto del cloruro de sodio (mM) sobre la Fotosíntesis, respiración y transpiración en *Paulownia fortunei*

	Fotosíntesis ($\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)		Respiración ($\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Transpiración ($\text{molH}_2\text{Om}^{-2}\text{s}^{-1}$)	
	19	26	26	19	26
NaCl (mM)					
0	4.11±1.16 a	6.56±1.36 ab	-1.48±0.60 a	4.26±0.97 a	0.46±0.21 b
20	2.13±0.95 a	9.01±3.48 ab	-7.48±4.85 a	4.09±1.60 a	0.78±0.43 b
40	-0.58±1.07 a	1.46±0.44 b	-4.25±3.09 a	6.72±2.70 a	2.36±0.40 a
60	2.97±2.21 a	17.96±6.34 a	-12.63±8.45 a	3.01±1.89 a	0.87±0.2 b
80	0.59±1.43 a			3.51±1.38 a	
160	-6.33±8.27 b			6.32±7.89 a	

Las letras muestran diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre concentraciones de NaCl en 19 y 26 días. Media±ES (n=3).

6.3.10 Conductancia estomática en *Paulownia fortunei*

En 19 y en 26 días no se observaron diferencias significativas en la conductancia estomática de *P. fortunei* en las condiciones de salinidad por cloruro de sodio. (Tabla 18). Lawlor (2002) mencionó que la disminución del contenido relativo de agua (RWC) en hojas, disminuye progresivamente la conductancia estomática. Sin embargo, con

las condiciones de salinidad impuesta en *P. fortunei* no se observó tal disminución. En experimentos efectuados con *Alternanthera philoxeroides*, la conductancia estomática disminuyó con el incremento en la salinidad (Longstreth *et al.*, 1984). En experimentos efectuados con mostaza (*Brassica juncea* L. Czern & Coss cv. Varuna) la conductividad estomática se redujo con 0, 25 y 50 mM de NaCl (Shah, 2007). En las glicófitas, los iones sodio dañan la función estomática, lo cual influye negativamente en las plantas para poder sobrevivir en condicione salinas (Robinson *et al.*, 1997).

Tabla 18. Efecto del cloruro de sodio sobre la Conductancia estomática ($\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$) en *Paulownia fortunei* en 19 y 26 días

NaCl (mM)	19 días	26 días
0	329.46±110 a	36.37±10.28 a
20	209.35±147.96 a	36.56±23.5 a
40	200.61±12.25 a	45.06±0.26 a
60	209.45±186.03 a	19.55±4.68 a
80	125.31±57.214 a	
160		

* Es solamente un dato

Las letras muestran diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre concentraciones en 19 y 26 días. Media±ES (n=3).

6.3.11 WUE (A/E) en *Paulownia fortunei*

La Tabla 19 muestra el efecto del cloruro de sodio en las concentraciones utilizadas en el presente estudio sobre la tasa instantánea de eficiencia de uso de agua (WUE) A/E, se

observa que el valor mas elevado se presentó en 60 mM de NaCl y disminuyó significativamente en 160 mM de cloruro de sodio, así como en el testigo. En 26 días no se observaron resultados significativos, con lo cual se observa que ambas especies produjeron resultados diferentes al ser sometidas a las concentraciones de cloruro de sodio mencionadas. La acumulación de algunos aminoácidos, como la prolina es la respuesta al daño producido por un metabolismo fotosintético alterado, en ocasiones, la prolina se incrementa por el bajo contenido de agua (RWC) (Lawlor, 2002).

6.3.12 CO₂ interno sobre CO₂ externo (C_i/C_a) en *Paulownia fortunei*

En la Tabla 19 se observa el CO₂ interno sobre el CO₂ externo, en 19 días se observa una disminución significativa en 60 mM de NaCl, mientras que en 26 días no se presentaron diferencias en las condiciones de salinidad en el presente estudio, lo cual se puede atribuir al daño causado a los tejidos, por lo cual la fotosíntesis se afectó.

Tabla 19. Efecto del cloruro de sodio sobre WUE y Ci/Ca en *Paulownia fortunei* en 19 y 26 días

	WUE (A/E)		Ci/Ca	
	19 días	26 días	19 días	26 días
NaCl (mM)				
0	0.98±0.19 b	5.14±0.41 a	0.93±0.009 a	0.85±0.049 a
20	0.65±0.29 ab	7.14±0.66 a	0.93±0.019 a	0.87±0.008 a
40	-0.024±0.11 abc	0.57±0.01 a	0.96±0.015 a	0.92±0.009 a
60	1.22±0.77 a	26.04±7.42 a	0.91±0.019 b	0.87±0.017 a
80	0.09±0.30 abc		0.94±0.012 ab	
160	-0.84±0.25 c		0.95±0.050 ab	

* Es solamente un dato

Las letras muestran diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre concentraciones en 19 y 26 días. Media±ES (n=3).

7. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede observar que *Paulownia imperialis* tuvo una respuesta diferente comparada con *Paulownia fortunei* para tolerar salinidad por cloruro de sodio en el medio de cultivo.

Es evidente que las concentraciones de cloruro de sodio utilizadas causaron una disminución en el crecimiento de las plantas de *P. imperialis*, lo cual fue observado también en *P. fortunei*, ocasionado por la alta concentración de iones sodio causando toxicidad en los tejidos de las plantas provocando la muerte de ambas especies en los niveles altos de salinidad (80 y 160 mM).

Los resultados muestran que *P. imperialis* acumuló más Na^+ en raíces que *P. fortunei*, ésto indica que *P. imperialis* es más tolerante al estrés por cloruro de sodio, debido a que el sistema radicular puede regular la entrada de iones de sodio.

Con respecto a la composición iónica, los resultados indican que tanto *Paulownia imperialis* como *Paulownia fortunei* pueden tolerar 60 mM de cloruro de sodio, ya que en concentraciones más altas que ese valor las plantas presentaron necrosis y murieron.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran la disminución del contenido de clorofila *a*, clorofila *b*, β -caroteno y violaxantina, por lo que no tuvieron efecto antioxidante, no pudieron reducir el daño provocado en los tejidos por la salinidad debido a la cual se observó disminución del crecimiento y muerte de las plantas.

Un indicador de la toxicidad del sodio en plantas sometidas a estrés, es la disminución de proteínas y la baja actividad de las enzimas que se determinaron

(peroxidasas, catalasas) muestran daño provocado por el efecto del cloruro de sodio en ambas especies.

La inhibición de la actividad de catalasa se presenta en muchas plantas sometidas a estrés salino. El incremento observado tanto en *P. imperialis* como en *P. fortunei* en 15 días de incubación en el valor de TBARS puede indicar una peroxidación de lípidos de los componentes de la membrana celular causado por especies reactivas de oxígeno los cuales se generan por el estrés oxidativo y los resultados demuestran que el estrés por cloruro de sodio provocó un estrés oxidativo en *P. imperialis* y *P. fortunei* hasta 60 mM, como se muestra por el incremento en la peroxidación de lípidos, ocasionando pérdidas en pigmentos. La acumulación de prolina, disminución de proteínas y de pigmentos son respuestas fisiológicas de *P. imperialis* y *P. fortunei* provocado por el estrés por cloruro de sodio.

En este estudio se observó una respuesta distinta entre ambas especies con respecto a la acumulación en los niveles de prolina en las concentraciones de cloruro de sodio a las que fueron sometidas las plantas, lo cual sugiere una diferencia en la sensibilidad que presentan a la tolerancia al estrés salino, se observa que *P. imperialis* es más tolerante a las condiciones de salinidad que *P. fortunei*.

Con respecto a la fotosíntesis, respiración, conductancia estomática, transpiración, resistencia estomática y la tasa instantánea de eficiencia de uso de agua (WUE) (A/E), los resultados obtenidos muestran una variación entre las dos especies utilizadas en el presente estudio, debido a que en condiciones de estrés con cloruro de sodio a las que fueron sometidas las plantas, alteran su metabolismo y su desarrollo. Los resultados indican daño en fotosíntesis de ambas especies con tiempo de exposición al cloruro de sodio. *P. fortunei*

mostró mayor sensibilidad al incremento de sal que *P. imperialis*, la cual mostró una respuesta positiva en fotosíntesis al estrés salino. El estrés producido por cloruro de sodio en *Paulownia imperialis* así como en *Paulownia fortunei* se reflejó en un incremento de la respiración, debido al mayor costo metabólico necesario requerido para la tolerancia a las sales. La menor resistencia al estrés salino estuvo asociada a mayores conductancias estomáticas de las hojas, las cuales no son mantenidas al paso del tiempo, ya que se observó que disminuyeron a los 26 días. Las elevadas tasas iniciales de transpiración, están asociadas a la deshidratación de las hojas, debido al escaso control en la apertura estomática relacionada con el estrés de sal. Un mayor control estomático a los 26 días observado en los resultados está relacionado con la resistencia diferencial mostrada por ambas especies al estrés salino. Debido a que el estrés salino ocasionó una apertura estomática no uniforme.

Los resultados indican que ambas especies no toleraron los niveles elevados de salinidad a los que se sometieron en el presente estudio, debido a que disminuyeron su crecimiento y murieron en 80 y 160 mM de cloruro de sodio.

De acuerdo a estos resultados y a los parámetros de Allison *et al.* (1977) y Ansari *et al.* (1999) quienes consideran las especies moderadamente tolerantes a la salinidad en un rango de 20 a 60 mM, las especies de *Paulownia* estudiadas se clasifican como moderadamente tolerantes al estrés salino.

El conocimiento de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos en plantas de *Paulownia* en estrés salino, permite idear estrategias para su manejo e implementación en condiciones de estrés.

Por lo anterior, *Paulownia imperialis* se recomienda para ser plantada en suelos que no sobrepasen los niveles de 60 mM de cloruro de sodio para iniciar reforestación, especialmente en zonas áridas y semiáridas.

8. LITERATURA CITADA

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro: Packer, L. Ed. Methods in enzymology. V. 105: Oxygen radicals in biological systems: Academic press. Inc E. U. A. pp. 121-126.
- Alscher, R. J. L. Donahue and C. L. Cramer. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiologia Plantarum* 100: 224-233.
- Allison, L. E., J. W. Brown, H. E. Hayward, L. A. Richard, L. Bernstein, M. Fireman, G. A. Pearson, L. W. Wilcox, C. A. Bower, J. T. Hatcher and R. C. Reeve. 1977. Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos. Editorial Limusa, México. P. 7-57.
- Ansari, R., S. Manzoor; S. Shamshad; S.E. Marcar and S. Ismail. 1999. Response of woody species to salinity. In: Pessaraky M. [ed], Handbook of plant and crop stress. Marcel Dekker, Inc. 931-946.
- Amotz-Ben and M. Avron. 1997. On the factor which determine the massive β -caroteno accumulation in the halotolerant algae *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*. 72:593-597.
- Andrews, P. K. 2002. How foliar-applied nutrients affect stresses in perennial fruit plants. *Acta Hort.* 594, ISHS. 49-55.
- AOAC International. 1998. 3. Plants. University of Georgia. Chapter editor. Robert A. Isaac. P.3.1-3.22.
- Apse M. P. and E. Blumwald. 2002. Engineering salt tolerance in plants. *Plant Biotechnology*. 13:146-150.
- Bergmann, B. A. 2003. Five years of *Paulownia* field trials in North Carolina. *New Forests*. 25: 185-199.

Bergmeyer, H. U. 1974. Methods of enzymatic analysis. Academic Press. New York. 2: 613-617.

Bidwell, R. G. S. 1979. Fisiología vegetal. A. G. T. editor, S. A. México, D. F. p.588.

Bhivare V.N. and Nimbalkar J.D. 1984. Salt stress effect on growth and nutrition of French bean. Plant Soil. 80: 91-98.

Bohnert, H. J.; D. E. Nelson and R. G. Jensen. 1995. Adaptation to environmental stresses. The Plant Cell. 7: 1099-1111.

Bolu, W. H. and A. Polle. 2004. Growth and stress reactions in roots and shoots in a salt-sensitive poplar species (*Populus x canescens*). Tropical Ecology. 45(1): 161-171.

Bonner, F. T. 1995. *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Sieb. & Zucc. Ex Steud, royal paulownia. In: Burns R. M, Honcala B H, tech. Coords. Silvics of North America. Vol. 2, Hardwoods. Agric. Handbk. 654 Washington, D. C: USDA Forest Service: 501-502.

Borsani, O. V. Valpuesta and M. A. Botella. 2003. Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 101-115.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-54.

Caplan, A., B. Claes, R. Dekeyser, and M. Van Montagu. 1990. Salinity and drought stress in rice. The impact of biotechnology in agriculture. Kluwer Academic Publishers. 391-402 pp.

Cavagnaro, J. B., M. T. Ponce, J. Guzmán, and M. A. Cirrincione. 2006. Argentinian of cultivars of *Vitis vinifera* grow better than European ones when cultured *in vitro* under salinity. *Biocell*. 30(1):1-7.

Cavalcanti, F. R., J. T. Abreu Oliveira, A. S. Martin Miranda, R. Viegas and J. Gómez. 2004. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. *New Phytologist*. 163: 563-571.

Cowan, A.K., Rose P.D. & Horne L.G. 1992. *Dunaliella* saline: A model system for studying the response of plant cell to stress. *Journal of Experimental Botany*. 43: 1535-1547.

Cramer, G. R., A. Laäuchli, ans V. S. Polito. 1985. Displacement of Ca^{2+} by Na^{+} from the plasmalemma of root cells. *Plant Physiol*. 79:207-211.

Cramer, G. R. 2002. Sodium-calcium interactions under salinity stress. In: Läuchli, A. Lüttge U. Eds. *Salinity. Enviroment-plants-molecules*: Dordrecht: Kluwer. 205-227.

Cuartero, J.; M. R. Fernández. 2003. Tomato and salinity. *Journal: Scientia Horticulturae*. 78(1-4):83-125.

Cushman, J. 2001. Osmoregulation in plants: Implications for agriculture. *Amer. Zool*. 41:758-769.

Chaari-Rkhis, A.; M. Maalej, S. O. Messaoud and N. Drira. 2006. *In vitro* vegetative growth and flowering of olive tree in response to GA3 treatment. *African Journal of Biotechnology*. 5(2): 2097-2032.

Chapman H. D. and Parker F. Pratt. 1997. *Methods of Analysis for soils, plants and waters*. Chapman publisher: Riverside, C. A.

Chartzoulakis, K. S. 2005. Salinity and olive: Growth, salt tolerance, photosynthesis and yield. *Agricultural Water Management*. 78:108-121.

Cha-um, S., C. Kirdmanee and K. Supaibulwatana. 2004a. Biochemical and Physiological Responses of Thai Jasmine rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica* cv. KDML105) to Salt Stress. *Science Asia*. 30: 247-253.

Cha-um, S., K. Mosaleeyanon, K. Supaibulwatana and C. Kirdmanee. 2004b. Physiological responses of Thai neem (*Azadirachta siamensis* Val.) to salt stress for salt-tolerance screening program. *ScienceAsia*. 30: 17-23.

Cha-um, S., K. Supaibulwatana and C. Kirdmanee. 2006. Water relation, Photosynthetic Ability and Growth of Thai Jasmine rice (*Oryza sativa* L. ssp. *Indica* cv. KDML 105) to Salt Stress by Application of Exogenous Glycinebetaine and Choline. *J. Agronomy & Crop Science* 192: 25-36.

Chinnusamy, V. and Jian-kang Zhu. 2003. Plant salt tolerance. *Topics in current genetic*. Vol.4. H. Hirt, K. Shinozaki. Eds. *Plant Response to Abiotic Stress*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. P: 241-263.

Chinnusamy, V. A. Jagendorf and Jiang-Kang Zhu. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science* 45:437-448.

Del Amor, F.; M. Martínez and A. Cerdá. 2001. Salt tolerance of tomato plants as affected by stage of plant development. *HortScience*. Vol. 36(6): 1260-1263.

Di Martino, Catello, Sebastiano D., R. Pissuto, F. Loreto and A. Fuggi. 2003. Free amino acid and glycine betaine in leaf osmoregulation of spinach responding to increasing SALT stress. *New Phytologist*. 158:455-463.

Dimps, R., Chong.-Jin., and Prakash. P.Kumar. 1993. High frequency plant regeneration from excised leaves of *Paulownia fortunei*. Biol. 29:72-76.

Dracup, M. 1991. Increasing Salt tolerance of plants through cell culture requires greater understanding of tolerance mechanisms. Aust. Journal Plant. Physiology. 18:1-15.

El-baky, A. H.; Hanna, M.; A. Amal and M. M. Hussein. 2003. Influence of salinity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and electrophoretic patterns of protein and isoenzymes in leaves of some onion cultivars. Asian Journal of plant sciences. 2(8):633-638.

El-Sayed, A. A., I. A. Ibrahim, A. El-Tantawy and A. M. Arafa. 1995. Effect of sodium chloride on the different morphogenetic parameters of *Paulownia tomentosa* var. *pallida* cultured in vitro. Egypt. J. Agric. Res. 73(1):210-227.

Farhatullah R.M. and Raziuddin. 2002. In vitro effect of salt on the vigor of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets. Biotechnology, 1. vol 2-4:73-77.

Fiorino, P. and F. Loreti. 1987. Propagation of fruit trees by tissue culture in Italy. HortScience. 22(3):353-358.

Flowers, T. J. 2004. Improving crop salt tolerance. Journal of Experimental Botany. 55 (396): 307-319.

Franco, O., J.E.Filho, J. T. Prisco and E.G.Filho. 1999. Effects of CaCl_2 on growth and osmoregulator accumulation in NaCl stressed cowpea seedlings. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal. 11(3):145-151.

Franklin, J. A. and J. J. Zwiazek. 2004. Ion uptake in *Pinus banksiana* treated with sodium chloride and sodium sulphate. Physiologia Plantarum. 120: 482-490.

García, M. and T. Charbaji. 1993. Effect of sodium chloride salinity on cation equilibria in grapevine. *Journal of Plant Nutrition*. 16(11):2225-2237.

García, A. B., J. Almeida, S. Iyer, T. Gerats, M. Van Montagu and A. B. Caplan. 1997. Effects of osmoprotectant upon NaCl stress in rice. *Plant Physiol*. 115: 159-169

Goykovic, C. V. and G. Saavedra del Real. 2007. Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo. *IDESIA*. Vol. 25. No. 3.p. 47-58.

Graifenberg, A.; L. Botrini, L. Giustiniani and M. Lipocci Di Paola. 1996. Salinity affects growth, yield and elemental concentration of fennel. *Hortscience* 31(7):1131-1134.

Grieve, C. M.; M. C. Shannon and D. A. Dierig. 1999. Salinity effects on growth, shoot-ion relation and seed production of *Lesquerella fendleri*. J. Janick (ed). *Perspectives on new crops and new uses*. ASHS Press. Alexandria, V. A.p.239-243.

Gzik, A. 1996. Accumulation of proline and pattern of α -amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt stress. *Environmental and Experimental Botany*. V. 36. No. 1:29-38.

Hasegawa, P. M., R. A. Bressan, J. K. and Handa, A. K. 1986. Cellular mechanisms of salinity tolerance. *Horticultural Science* 21:1317-1324.

Hasegawa, P. M., R. A. Bressan, J. K. Zhu and H. J. Bohnert. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 51: 463-499.

Hare, P. D.; W. A. Cress & J. V. Staden. 1998. Dissecting the roles of osmolyte during stress. *Plant Cell and Environment*. 21: 535-553.

Harinasut, P.; D. Poonsopa, K. Roengmongkol and R.Charoensataporn. 2003. Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. *Science Asia* 29:109-113.

Hayat, M A. 1972. Basic electron microscopy techniques. Van Nostrand Reinhold Company. P. 50, 98.

Hernández, J. A., F. J. Corpas, M. Gómez, L. A. del Río and F. Sevilla. 1993. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiologia Plantarum*. 89: 103-110.

Ipekci, Z., A. Altinkut, K. Kasan, K. Bajrovic and N. Gozukirmizi. 2001. High frequency plant regeneration from nodal explants of *Paulownia elongata*. *Plant Biology*. 3(2): 113-115.

Ipekci, Z. and N. Gozukirmizi. 2003. Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. *Plant cell rep. Cell biology and morphogenesis* 22:16-24.

James, R. A., A. R. Rivelli, R. Munns and S. V. Caemmerer. 2002. Factors affecting CO₂ assimilation, leaf injury and growth in salt-stressed durum wheat. *Functional Plant Biology*. 29: 1393-1403.

Jain, S. M. and K. Ishii. 2003. Micropropagation of woody and fruits. Kluwer Academic Publisher. P.37-74, 640.

Jiménez, V. M. y E. Guevara. 1995. Regeneración *in vitro* mediante embriogénesis somática de variedades de cítricos. I Obtención de callo friable y suspensiones celulares de naranja dulce (*Citrus sinensis*) y naranja agria (*Citrus aurantium*) cultivados en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 19(2): 7-18.

Kishor, K. P. B., S. Sangam, R. N. Amrutha, P. SriLaxmi, K. R. Naidu, K.R.S.S. Rao, Sreenath Rao, K. J. Reddy, P. Theriappan and N. Screenivasulu. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plants growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* 88 (3): 424-438.

Kozlowski, T. T. 1997. Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiology Monograph* No.1

Kumar, V. and D. R. Sharma. 1989. Isolation and characterization of sodium chloride-resistant callus culture of *Vigna radiate* (L) Wilczek var. *radiate*. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 40. No. 210. 143-147.

Kumar, J. Rajinder.; S. Navinder and J. Sunita. 2003. Engineering salinity tolerance in crop plants. *Journal: Physiology and molecular biology of plants*. 9(1):p29-39.

Lawlor, D. 2002. Limitation to photosynthesis in water –stressed leaves: Stomata vs metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany*. 89: 871-885.

Lazova, G. N., T. Naidenova and K. Velinova. 2004. Carbonic anhydrase activity and photosynthetic rate in the tree species *Paulownia tomentosa* Steud. Effect of dimethylsulfoxide treatment and zinc accumulation in leaves. *J. Plant Physiol*. 161: 295-301.

Longstreth David J. and P. Nobel. 1979. Salinity Effects on leaf anatomy. *Plant Physiology*. 63: 700-703.

Longstreth, D.; J. A. Bolaños and J. E. Smith. 1984. Salinity effects on Photosynthesis and growth in *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Grises.

Loupassaki, M. H. K. S. Chartzoulakis, N. B. Digalaki and I. I. Androulakis. 2002. Effects of salt stress on concentration of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, magnesium and sodium in leaves, shoots and roots of six olive cultivars. *Journal of Plant Nutrition*. Vol.25. 11. 2457-2482.

Lutts, S., Majerus V and Kinet J-M (1999). NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oriza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum*. 105: 450-458.

Maathuis, F. J. M. and A. Amtmann. 1999. K⁺ Nutrition and Na⁺ toxicity: The basics K⁺/Na⁺ ratios. *Annals of Botany*. 84:123-133.

Matthew, A. J.; P. M. Hasegawa and S. J. Mohan. 2007. Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerance crops. Ed. Springer. pP 432.

Maggio, A.; S. Miyazaki;; P. Veronese;; T. Fujita;; J. I. Ibeas. B. Damsz;; M. L. Narasimhan;; P.M. Hasegawa;; R. J. Joly and R. A. Bressan. 2002. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction?. *The Plant Journal*. 31(6): 699-712.

Mahmood, R. and Raziuddin. 2002. In vitro effect of salt on the vigor of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets. *Biotechnology*. 2-4:73-77.

Marcum, K. B.; G. Weiss.; D.T. Ray and M.C. Engelke. 2003. <http://www.usga.org/turf/green-section-record.zoysiagrass.html>

Maslenkova, L.; N. Gambarova and Y. Zeinalov. 1995. NaCl-Induced changes in oxygen evolving activity and thylakoid membrane patterns of barley plants. Adaptation to salinity. *Bulg Journal. Plant Physiology*. 21(1): 29-35.

Masojidek, J.; G. Torzillo, J.; J. Kopecky, ; M. Koblizek, L.;Nidiaci, J. Komenda, A. Lukavska and A. Sacchi. 2000. Changes in chlorophyll fluorescence quenching and

pigment composition in the green *Chlorococcum* sp. Grown under nitrogen deficiency and salinity stress. *Journal of Applied Phycology*. 12:417-426.

Mc Means, O.; R. M. Skirvin, A. Otterbacher and G. Mittiku. 2006. Assessment of tissue culture-derived “Gala” and “Royal Gala” apples (*Malus domestica* Borkh.) for somaclonal variation. 2006. *Euphytica*. V. 103. No. 2:251-257.

McNeil, S. D.; M. L. Nuccio and A. D. Hanson. 1999. Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiology*. V. 120: 945-949.

Mehari, A.; T. Ericsson,; M. Wieh. 2005. Effects of NaCl on seedling growth, biomass production and water status of *Acacia nilotica* and *A. tortilis*. *Journal of Arid Enviroments*. 62: 343-349.

Mittova, V.; M. Guy, M. Tal and M.Volokita. 2004. Salinity u-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of Experimental Botany*. 55(399): 1105-1113.

Morales, F., A. Abadía, J. Gómez-Aparici, J. Abadía. 1992. Effects of combined NaCl and CaCl₂ salinity on photosynthetic parameters of barley grown in nutrient solution. *Physiologia Plantarum*. 86(3): 419-426.

Moradi, F. and A. M. Ismail. 2007. Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. *Annals of Botany*. 99: 1161-1173.

Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Enviromental*. 25: 239-250.

Munns, R., R. A. James and A. Läuchli. 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*. 57(5):1025-1043.

Muthuri, C. W.; C. K. Ong, C. R. Black; V. W. Ngumi and V. M. Mati. 2005. Tree and Crop productivity in *Grevillea*, *Alnus* and *Paulownia*-based agroforestry systems in semi-arid Kenya. *Forest Ecology and Management*. 212: 23-39.

Nanjo, T.; M. Kobayashi, Y. Yoshiba, Y. Kakubari, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki. 1999. *FEBS Letters* 461: 205-210.

Nentondo, G. W., J. Collins and E. Beck. 2004. Crop physiology & metabolism. Sorghum and salinity: I. Response of growth, water relations, and ion accumulation to NaCl salinity. *Crop Sci*. 44:797-805.

Niembro, A. 1990. Árboles y arbustos útiles de México. Ed. Limusa. P. 139-140.

Noitsakis, B.; K. Dimassi and I. Therios. 1989. Effects of NaCl induced salinity on growth chemical composition and water relations of two almond (*Prunus amygdalus* L.) cultivars and the hybrid GF-677 (*Prunus amygdalus*x*Prunus persica*). *ISHS Acta Horticulturae*. 404.

Pearcy, R. W. and S. L. Ustin, 1984. Effects of salinity on growth and photosynthesis of three California tidal marsh species. *Oecologia*. 62: 68-73.

Pérez, M. E. M., R. Ramírez M., H. Núñez P, y N. Ochoa A. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Univ. Autónoma de Aguascalientes. 179 pp.

Persky, A. M.; P.S. Green; L. Stuble; C. O. Howell, L. Zaulyanov; G. A. Brzaeau and J. W. Simpkins. 2000. Protective effect of estrogen against oxidative damage to heart

and skeletal muscle in vivo and in vitro. Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine. 223: 59-66.

Prieto, C. M. 1998. Degradación de tierras por el riego. Prevención y control de la salinidad y del exceso de agua en el suelo. Memorias de Symposium internacional sobre la utilización y aprovechamiento de la flora silvestre de zonas áridas. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. 205-211.

Qiu, N. Q. Lu and C. Lu. 2003. Photosynthesis, photosystem II efficiency and the xanthophylls cycle in the salt adapted halophyte *Atriplex centralasiatica*. New Phytologist. Vol.159(2):479.

Rao, Au., Goh., C. J. Kumar, P. P. 1993. High frequency plant regeneration from excised leaves of *Paulownia fortunei*. In vitro celular & developmental biology plant. VI p29.

Rhathinasabapathi, B. 2000. Metabolic engineering for stress tolerance: Installing osmoprotectant synthesis pathways. Annals of Botany. 86: 709-716.

Robinson M. F. A-A. Véry, D. Sanders and T. A. Mansfield. 1997. How can stomata contribute to salt tolerance? Annals of Botany. 80: 387-393.

Sánchez, C. A. and J. C. Silvertooth. 1996. Managing saline and sodic soils for producing horticultural crops. Hort Technology. V(6) 2 99-100.

Sánchez, D. H., M. R. Siahpoosh, U. Roessner, M. Udvardi and J. Kopka. 2008. Plant metabolomics reveals conserved and divergent metabolic responses to salinity. Physiologia Plantarum. 132: 209-219.

Sankhla, N.; H. S. Gehlot, R. Choudhary, S. Joshi and R Dinesh. 2006. Eco-physiological studies on Indian desert plants: Effect of salt on antioxidant defense system in *Ziziphus* Spp. Khan and Weber (eds.) *Ecophysiology of High Salinity Tolerant Plants*. 201-213.

Sairam, R. K. and A. Tyagi. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*. 86. No.3: 407-421.

Shabala, S.; L. Shabala, E. Van Volkenburg and I. Newman. 2005. Effect of divalent cations on ion fluxes and leaf photochemistry in salinized barley leaves. *Journal of Experimental Botany*. 56 (415): 1369-1378.

Shah, S. H. 2007. Effects of salt stress on mustard as affected by gibberellic acid application. *Gen. appl. Plant Physiology*. 33(1):97-106.

Shalata A. and M. Tal. 1998. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiologia Plantarum*. 104: 169-174

Shannon, M. C. and C. L. Noble. 1995. Variation and ion accumulation among subterranean clover cultivars. *Crop Science*. 35: 798-804.

Sivritepe, N. and A. Eris. 1999. Determination of salt tolerance in some grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) under *in vitro* conditions. *Tr. J. Biology*. 23:473-485.

Song, J.; X. Ding; G. Feng and F. Zhang. 2006. Nutritional and osmotic roles of nitrate in a eucalyphyte and a xerophyte in saline conditions. *New Phytologist*. 357-366.

Sun, D. and G. R. Dickinson. 1995. Survival and growth responses of a number of Australian tree species planted on a saline site in tropical north Australia. *Journal of Applied Ecology*. 32: 817-826.

Tal, M., I. Rosental, R. Abramovitz and M. Forti. 1979. Salt tolerance in *Simmondsia chinensis*: Water balance and accumulation of chloride, sodium and proline under low and high salinity. *Ann. Bot.* 43: 701-708.

Távora, F.; R. G. Ferreira, and F. F. Hernández. 2001. Crescimento y relações hídricas em plantas de goiabeira submetidas a estrés salino com NaCl. *Rev. Bras. Frutic.* 23(2):441-446.

Tattini, M.; P. Bertoni and S. Caselli. 1992. Genotypic responses of olive plants to sodium chloride. *Journal of plant nutrition.* 15 (9): 1467-1485.

Tester, M. and R. Davenport. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany.* 91: 503-527.

Torres, R. E. 1983. *Agrometeorología*. Ed. Diana. México. 149 p.

Trigiano, Robert, N. and D. J. Gray. 2000. *Plant tissue culture concepts and laboratory exercise*. C. R. Press LLC. P 25.

Troncoso, A. C. M., M. Cantos and S. Lavee. 1999. Evaluation of salt tolerance of in vitro-grown grapevine rootstock varieties. *Vitis.* 38(2), 55-60.

Tsugane, Kasuo,; Kyoko Kobayashi,; Yasuo Niwa,; Yasushi Ohba,; Keishiro Wada and Hirokazu Kobayashi. 1999. a recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *The Plant Cell.* 11. 1195-1206.

Tuna, A. L., C. Kaya, D. Higos, B. Murillo, S. Aydemir and A. R. Girgin. 2008. Silicon improves salinity tolerance in wheat plants. *Environmental and Experimental Botany.* 62: 10-16.

Turhan, E. and A. Eris. 2004. effects of sodium chloride applications and different growth media on ionic composition in strawberry plant. *Journal of Plant Nutrition*. 27 (9): 1653-1665.

Turhan, E. and A. Eris. 2005. Changes of micronutrients, dry weight and chlorophyll contents in strawberry plants under salt stress conditions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 36 (7-8):1025-1028.

Turhan, E. and A. Eris. 2007. Growth and stomatal behavior of two strawberry cultivars under long-term salinity stress. *Turk J. Agric. For.* 31:55-61.

Vázquez, O. F., G. Caire, I. Higuera and G. Hernández. 1995. High performance liquid chromatographic determination of free aminoacids in shrimp. *Journal of Liquid Chromatography*. 18(10):2059-2068.

Vidussi, F., H. Claustre, J. Bustillos-Guzmán, C. Cailliau and J. C. Marty. 1996. Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of chlorophyll *a* from dininyl-chlorophyll *a* and zeaxanthin from lutein. *Journal of Plankton Research*. 18(12):2377-2382.

Villalobos, V. M. and Thorpe. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Publicación CIAT. No. 51. Unidad de Investigación en Biotecnología. Ed. XYZ, Cali, Colombia.

Vranová, E. D. Inzé and F. V. Breusegem. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of experimental botany*. 53 (372): 1227-1236.

Wahome, P. K. 2003. Mechanisms of salt (NaCl) stress tolerance in horticultural crops- mini Review. *Acta Hort*. 609:127-131.

Wang, W., B. Vinocur and A. Altman. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: toward genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14.

Watanabe, S., K. Kojima, Y. Ide and S. Sasaki. 2000. Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 63: 199-206.

Xiong, L. and J.K. Zhu. 2002. Molecular and genetic aspects of plant response to osmotic stress. *Plant, Cell & Environment*. 25: 131-138.

Yamamoto, A. Le-Sung Shim, S. Fujihara, T. Yoneyama and K.Usui. 2003. Physiochemical factors affecting the salt tolerance of *Echinochloa crus-galli*. Beauv. Var. *formosensis* Ohwi. *Weed Biology and management*. 3:98-104.

Yildirim, Ö., S. Aras and A. Ergül. (2004). response of antioxidant systems to short-term NaCl stress in grapevine rootstock-1616c and *Vitis vinifera* L. cv. Razaki. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 46: 151-158.

Zamacona, D y S. G. Moreno. 2005. Efecto de la salinidad en la captación de cationes, síntesis de prolina y eventos fotoquímicos primarios del fotosistema II en *Quercus rugosa*. Primer Foro de Experiencias PAEA. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Sría. Gral. Académica. 1-7 pp.

Zhi, Qi and E. P. Spalding. 2004. Protection of plasma membrane K⁺ transport by the salt overly sensitive Na⁺-H⁺ antiporter during salinity stress. *Plant Physiology*. 136: 2548-2555.

Zhu, Jian-Kang. 2001. Plant salt tolerance. *TRENDS in Plant Science*. 6(2).

Zyalalov, A. 2004. Water flows in higher plants: physiology, evolution, and system analysis. *Russian J. Plant Physiol.* 51(4): 547-556.

<http://www.agrodesierto.com/paulownia.html>.

<http://www.idre.ca/library/document/071235/071235e.htm>.

<http://www.xerics.com/paulownia.html>.

9. Apéndice I

Tabla 1. Escala de conductividad (milimhoscm⁻¹ a 25° C).

Efectos despreciables a la salinidad.	Los rendimientos de los cultivos muy sensibles pueden ser restringidos.	Rendimientos de muchos cultivos son restringidos.	Solo cultivos tolerantes rinden satisfactoriamente.	Poquísimos cultivos tolerantes rinden satisfactoriamente.
0	2	4	8	16 mmhoscm ⁻¹

Fuente: Allison *et al.*, 1977

Tabla 2. Concentraciones de cloruro de sodio utilizadas

Cloruro de Sodio		*dSm ⁻¹
%	mM	mmhoscm ⁻¹
0	0	0
0.128	20	2
0.256	40	4
0.384	60	6
0.512	80	8
1.024	160	16

*Fuente: Allison *et al.*, 1977.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo WPM

Sales	mgmL ⁻¹
NH ₄ NO ₃	400
CaNO ₃ *4H ₂ O	556
K ₂ SO ₄	990
CaCl ₂ +2H ₂ O	96
MgSO ₄ +7H ₂ O	370
K ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ *4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ *5H ₂ O	0.025
FeSO ₄ *7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	37.4
Vitaminas	
M-INOSITOL	100
PIRIDOXINA-HCl	0.5
ÁCIDO NICOTÍNICO	0.5
TIAMINA-HCl	0.1
GLICINA	2.0
SACAROSA	30000
AGAR	8000

Fuente: Trigiano and Gray, 2000

10. Apéndice II

1.- Ayala-Astorga, G. I. Alcaraz-Meléndez, L., Pacheco-Ayala F. and Alejandro E. Castellanos V. 2008. Effect of sodium chloride on *Paulownia imperialis* (Shielbold & Zuccarini) and *Paulownia fortunei* (Seemann and Hemsley) plants growing *in vitro*. *Agrochimica* (en prensa).

2.- Ayala-Astorga, G. I. and Alcaraz-Meléndez. 2008. NaCl effect on proleín, proline, TBARS and Pigments in *Paulownia imperialis* (Shielbold & Zuccarini) and *Paulownia fortunei* (Seemann and Hemsley) *in vitro*. *Biocell* (enviada, en revisión)