



ARTÍCULO ORIGINAL

Aclimatación de *Nicotiana tabacum* 'Criollo' 98' (Solanaceae) a la salinidad creciendo en condiciones de hidroponía

Acclimation of Nicotiana tabacum 'Criollo' 98' (Solanaceae) to salinity under hydroponic conditions

Patricia Ortega-Rodés, Mayté Pernús, Rosa Rodés y Eduardo Ortega

Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

RESUMEN

A lo largo de su ciclo de vida, las plantas están expuestas a varios tipos de factores estresantes externos, que impiden el mantenimiento de la homeostasis. La salinidad es uno de los principales factores adversos que afectan el crecimiento de las plantas y provoca grandes pérdidas en el rendimiento de muchos cultivos. En el mundo hay grandes extensiones de suelos salinizados de los que gran parte son suelos agrícolas. En Cuba el 20 % de los terrenos de cultivo están en peligro debido a la salinidad; las provincias donde se cultiva *Nicotiana tabacum*, no están exentas de este problema. Las plantas presentan varios tipos de respuestas al estrés como la síntesis de metabolitos y enzimas antioxidantes que contribuyen al proceso de aclimatación. Se determinó el efecto del estrés salino sobre procesos de fotosíntesis, respiración, formación de biomasa y la respuesta de sistemas de defensa en plantas de *N. tabacum* 'Criollo' 98', excelente para la producción de Habanos. La actividad fotosintética fue afectada en las primeras horas de enfrentar las plantas a la condición de salinidad impuesta en cultivo hidropónico (solución *Hoagland* suplementada con 150 mmol L⁻¹ NaCl); sin embargo, se observó una recuperación en un corto período de tiempo (7 d). Se detectó mayor concentración de clorofila total y carotenoides en plantas con el tratamiento salino, lo cual se interpreta como una posible aclimatación de la fotosíntesis a la salinidad. La actividad respiratoria fue semejante en plantas con tratamiento y plantas control. Otra respuesta de aclimatación de las plantas fue evidenciado por un mayor valor de la razón biomasa raíz: vástago en las plantas del tratamiento con sal, lo que pudiera contribuir a una mayor absorción de agua por las raíces en estas condiciones de estrés. Los estomas de las plantas sometidas a estrés salino reaccionaron cerrándose parcialmente y alcanzaron valores del 30 % al 50 % de las aperturas máximas registradas durante el ciclo diurno de las plantas control; esta disminución en la apertura estomática no influyó en la fijación de CO₂ de las plantas estresadas. Aunque se observó una aclimatación de la fotosíntesis, la superficie foliar y la biomasa de las plantas en medio

Autor para correspondencia:
ortega@fq.uh.cu

Recibido: 2015-07-18

Aceptado: 2016-01-10

salino fue drásticamente disminuida; asociado a esto hubo daños en las membranas celulares y cambios en la actividad de enzimas antioxidantes. La actividad catalasa y guaiacol peroxidasa en las hojas fueron 4 y 3 veces mayores (con relación a los controles) a partir de 1 h y 3 h de estar las plantas bajo tratamiento salino, respectivamente. La actividad SOD disminuyó 3 veces con relación al control en la primera hora de aplicar el estrés salino e incrementó hasta valores semejantes al control entre las 3 y 52 horas posteriores.

Palabras clave: Estrés salino, tabaco, fotosíntesis, densidad de estomas, especies reactivas de oxígeno (EROs), Solanaceae

ABSTRACT

*During their life cycle, plants are exposed to various types of external stressors, preventing the maintenance of homeostasis. Salinity is one of the main adverse factors affecting plant growth and causes great losses in the yield of many crops. In the world there are large areas of saline soils of which are largely agricultural soil. In Cuba 20% of agricultural land are at risk due to salinity; the provinces where *Nicotiana tabacum* is growing, are not exempt from this problem. The plants have various types of stress responses as synthesis antioxidant metabolites and enzymes which contribute to the process of acclimation. The effect of salt stress on processes of photosynthesis, respiration, biomass formation and defense response systems in plants of *N. tabacum* 'Criollo'98', excellent for the production of Habanos, was determined. The photosynthetic activity was affected in the early hours of face plants to salinity conditions imposed in hydroponics conditions (Hoagland solution supplemented with 150 mmol L⁻¹ NaCl); however recovery was observed in a short period of time (7 d). Higher concentration of total chlorophyll and carotenoids was detected in the leaves of plants with the saline treatment, which is interpreted as a possible photosynthetic acclimation to salinity. Respiratory activity was similar in salt treated and control plants. Another answer acclimation of plants was evidenced by a greater value of root: shoot biomass ratio in salt treated plants, which could contribute to increased water uptake by the roots in these stressful conditions. The stomata of the plants under salt stress reacted partially closing, reaching values of 30 % to 50 % of the maximum apertures recorded during the diurnal cycle of control plants; this decrease in stomatal opening did not influence the CO₂ fixation of stressed plants. Although it was observed an acclimation of photosynthesis in saline conditions, the leaf area and plant biomass were drastically decreased; this was associated with damage to cell membranes and changes in antioxidant enzyme activity. Catalase and guaiacol peroxidase activity in the leaves were 4 and 3-fold higher (relative to controls) after 1 and 3 h of being plants under saline treatment respectively. SOD activity decreased 3 fold relative to the control in the first hour of applying salt stress and increased to values similar to control between 3 and 52 hours later.*

Keywords: Saline stress, tobacco, photosynthesis, stomata density, reactive oxygen species (ROS), Solanaceae

INTRODUCCIÓN

El tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) es un cultivo de importancia económica a nivel mundial y en particular para Cuba, donde se produce un tabaco negro de muy alta calidad para la producción de habanos (Espino y Torrecilla, 1999; Borges *et al.*, 2012).

A lo largo de su ciclo de vida, todas las plantas están expuestas a factores estresantes externos bióticos y abióticos (Roháček *et al.*, 2008). El estudio de la respuesta de las plantas al estrés abiótico es una de las líneas de investigación más activas en la biología por las implicaciones de los efectos del estrés en la agricultura. Entre los factores abióticos se encuentra la salinidad de los suelos, uno de los problemas que más

afecta la producción global de alimentos, aspecto de gran importancia debido al rápido crecimiento de la población mundial.

De las provincias cubanas donde se cultiva el tabaco las que poseen mayores áreas afectadas por salinidad son Pinar del Río, Villa Clara, Sancti Spiritus, Granma y Holguín con áreas afectadas de 54, 81, 100, 277, 180 mil hectáreas respectivamente. Granma y Holguín parecen ser las provincias tabacaleras más amenazadas debido a los altos niveles de salinidad (>1,0 % de sales solubles totales) reportados por González-Núñez *et al.* (2004).

La comprensión de los cambios que tienen lugar en las plantas bajo estrés salino, sería una herramienta importante en la solución de dichos problemas (Zhang *et al.* 2011). Plantas de tabaco transgénicas han permitido entender el rol de diferentes metabolitos en la respuesta a la salinidad, constituyendo además, un modelo para el desarrollo de plantas tolerantes a este tipo de estrés (Holmström *et al.* 2000; Penna 2003; Tuteja 2005). Sin embargo, la información sobre el efecto de la salinidad sobre las respuestas fisiológicas como alteraciones en la expansión foliar, tasa fotosintética, apertura estomática y modificaciones de los sistemas antioxidantes son aún escasas para el cultivo del tabaco. Este trabajo evalúa las respuestas fisiológicas a la salinidad de plantas de *Nicotiana tabacum* 'Criollo'98' creciendo en hidroponía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de crecimiento vegetal y estrés salino

Semillas de *Nicotiana tabacum* 'Criollo'98' fueron germinadas en medio MS (Sigma-Aldrich) suplementado con 20 g L⁻¹ de sacarosa y 8 g L⁻¹ de agar contenido en un tubo de 1,5 mL. Las semillas fueron previamente esterilizadas superficialmente 5 min con solución de esterilización (4 µL Tritón X-100, 200 µL hipoclorito de sodio (12 %), 10 mL ddH₂O) y lavadas cuatro veces con ddH₂O.

Dos semanas más tardes, a los tubos que contenían las plántulas de tabaco se les eliminó el fondo para permitir que las raíces emergieran. Los tubos fueron colocados en bandejas que contenían 20 L de solución Hoagland (Hoagland y Arnon 1950) aireadas continuamente para proveer las condiciones necesarias para la respiración del sistema radical. El cultivo de hidropnía se realizó bajo condiciones semi controladas (temperatura: 27±1,5°C, iluminación: 100 µmol fotones m⁻² s⁻¹, 42,3 % HR, 12h luz/12h oscuridad).

Las condiciones de estrés fueron aplicadas a las plantas de 30 d de edad. Un grupo de plantas permaneció en las mismas condiciones de crecimiento (Control) en solución Hoagland con una conductividad de 2,02 mS cm⁻¹. A un segundo grupo de plantas se les cambió la solución de crecimiento por solución Hoagland suplementada con 150 mmol L⁻¹ NaCl que llevó la conductividad de la solución a 14,80 mS cm⁻¹.

El material vegetal fue cosechado a diferentes tiempos e inmediatamente analizado o congelado a -35°C

hasta su posterior análisis. Las hojas de *N. tabacum* fueron enumeradas desde el tope hacia la base del vástago.

Tasa de crecimiento e Intercambio de gases.

El área de las hojas fue calculada utilizando las imágenes de las hojas registradas en escáner CanoScanLi-de90 con una resolución de 300 dpi y a través del procesamiento y análisis de las imágenes con el Programa ImageJ (Abramoff *et al.* 2004).

La masa seca y fresca de vástagos y raíces fue medida utilizando una balanza digital (Mettler Toledo AB104, precisión 0,0001 g). Para las determinaciones de la masa seca, las muestras fueron secadas a 90°C en un horno hasta que el peso no varió. La longitud del vástago fue medido desde la base hasta el punto más apical.

Para medir la densidad y tamaño de los estomas, barniz de uñas incoloro transparente fue aplicado a la superficie de la hoja con una brocha y removida usando cinta adhesiva transparente como describen Wevers y Johansen (1985). Las impresiones obtenidas fueron analizadas con un microscopio óptico Olympus BX-40 unido a una cámara DP-70 usando el programa Stream Essentials 1.6.1 para el procesamiento de las imágenes.

La tasa neta de fotosíntesis y respiración fue determinada midiendo el incremento o disminución de la concentración de CO₂ en el aire que pasó por la hoja encerrada en una cubeta con la ayuda de un Analizador Infrarrojo de Gases (IRGA) Qubit Systems Inc, con sistema abierto. Las medidas fueron realizadas una vez por semana durante 4 semanas, con inicio 24 h después de la aplicación de las condiciones de estrés. Durante las mediciones de fotosíntesis las muestras de hojas (9 cm²) recibieron iluminación perpendicular de 185 µmol fotones m⁻² s⁻¹ y un flujo de aire saturado de agua de 200 mL min⁻¹. Durante la medición se evitó el sobrecalentamiento de las hojas con un filtro de agua de 1 cm de profundidad entre la fuente de luz y la hoja. Durante las mediciones de la respiración, la luz fue totalmente excluida cubriendo la cubeta con un tejido negro.

Pigmentos fotosintéticos, enzimas antioxidantes y daño oxidativo

Las clorofilas y los carotenoides se extrajeron de la muestra de hoja de 9 cm² a la que se midió la actividad fotosintética y respiratoria. Para ello se utilizó

una mezcla fría de acetona: NH_4OH (9:1, v/v) por el método descrito por Czarnecki *et al.* (2011); las concentraciones se determinaron espectrofotométricamente de acuerdo a Porra *et al.* (1989).

La actividad de enzimas antioxidantes catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y guaiacol peroxidasa (GPX) se determinó en el tejido foliar.

Un gramo de material vegetal fue macerado en mortero con la ayuda de nitrógeno líquido, homogeneizado con 3 mL de tampón fosfato de potasio (100 mmol L^{-1} , pH 7) y centrifugado a 15000 xg , 4°C durante 25 min. El sobrenadante fue utilizado para determinar la actividad CAT (Kato y Shimizu 1987), SOD y GPX (Sharma *et al.* 2007).

Los valores de densidad óptica fueron obtenidos en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS. El contenido de proteínas solubles fue determinado según Bradford (1976).

El daño de membrana se cuantificó mediante dos métodos: la salida de iones y la peroxidación lipídica. Para la determinación de la salida de iones se tomaron discos (2,5 cm de diámetro) de hojas y se siguió la metodología descrita por Palta *et al.* (1977). La salida de iones de la hoja fue calculada como $\text{Ci/Cf} \times 100$ (Gulen y Eris 2004) donde Ci y Cf son la conductividad eléctrica inicial y final respectivamente. La oxidación de lípidos fue determinado en 200 mg de tejido fresco homogeneizado en una mezcla de etanol: dd H_2O (80:20, v/v) en una proporción 1:25 (Pf/v). Dos alícuotas de 1 mL cada una fueron separadas después de centrifugar a 3000 xg . Una alícuota fue mezclada con 1 mL de TCA (20 % w/v) y la otra fue mezclada con 1 mL of TCA (20 %) suplementado con 0,65 % (w/v) ácido tiobarbitúrico (TBA). Ambas mezclas fueron calentadas a 95°C durante 25 min y la densidad óptica fue registrada a 440, 532 and 600 nm. El contenido de equivalentes de malondialdehído-MDA fue referido como la cantidad de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) y el cálculo se realizó de acuerdo con Hodges *et al.* (1999) y los valores se expresaron en equivalentes de MDA (nmol mL^{-1}).

Análisis estadístico

El programa STATISTICA versión 7, StatSoft Inc. (2004) fue utilizado para el análisis de los datos. Los datos que cumplieron con las premisas de distribución normal (chi-cuadrado y homogeneidad de varianza) (prueba de Levene) fueron analizados por prueba paramétrica, de no cumplirse la premisa, se empleó

una prueba no paramétrica. Un ANOVA simple se utilizó para analizar los diseños con variables independientes de categoría simple. El ensayo de rangos múltiples empleado fue la prueba de Tukey y para la comparación con un grupo control se realizó la prueba de Dunnett. Kruskal Wallis fue utilizado en las pruebas no-paramétricas.

Los resultados de los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de significación de $\alpha=0,05$.

RESULTADOS

Las plantas de *N. tabacum* 'Criollo'98' crecidas bajo condiciones de salinidad ($150 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$) mostraron una baja área foliar y una menor biomasa total comparada con las plantas control (Fig. 1 A, B). Se observaron diferencias significativas en el área foliar 15 d después de establecidas las condiciones de estrés con valores que fueron la mitad del valor del control. Después de 27 d del tratamiento de estrés, la diferencia fue mayor con valores 7 veces menores en las plantas estresadas.

La relación de biomasa vástago/raíz fue diferente a partir del segundo muestreo (8 d después del tratamiento) entre el control y las plantas estresadas, alcanzando una relación menor en plantas bajo estrés salino, indicando una estimulación del crecimiento de las raíces y una disminución del crecimiento del vástago (Fig. 1 C).

La tasa fotosintética de la hoja es mucho menos sensible a la disminución de la presión de turgencia que la expansión celular (Boyer 1970). Sin embargo, un estrés de agua ligero usualmente afecta tanto la fotosíntesis foliar y la conductancia estomática (Sung y Krieg 1979; Ribas-Carbo *et al.* 2005). La tasa de fotosíntesis y respiración así como la apertura estomática fueron analizadas para conocer en qué medida el estrés salino tiene efecto en el intercambio gaseoso.

Después de 24 h de estrés salino, la actividad fotosintética de las plantas de tabaco fue alrededor de la mitad (46 %) comparado con las plantas control (Fig. 2 A). Sin embargo, una semana más tarde del comienzo del estrés salino, la actividad fotosintética fue similar en ambos grupos de plantas. No hubo diferencia en la actividad respiratoria en plantas tratadas en ninguno de los tiempos de muestreo (Fig. 2 B).

Las plantas bajo condiciones de salinidad por 20 d no modificaron significativamente la densidad de los estomas (Fig. 3 A); sin embargo, la salinidad afectó la

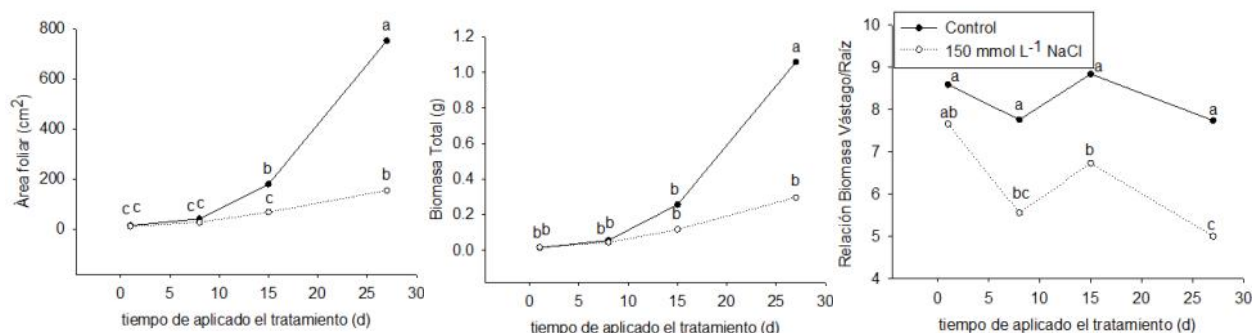


Figura 1. Efecto de la salinidad en el área foliar (A), biomasa total (B), y relación biomasa vástago/raíz (C) en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* 'Criollo'98'). Letras diferentes denotan diferencias significativas entre muestras ($P < 0,05$) por prueba de Tukey; $n = 3$. Las diferencias en la biomasa entre el control y las plantas estresadas fueron solo significativas después de 27 d de estrés; obteniéndose valores siete veces menores que el control.

Figure 1. Effect of salinity on leaf area (A), total biomass (B), and shoot/root biomass ratio (C) in tobacco (*Nicotiana tabacum* 'Criollo'98') plants. Different letters mean significant difference among samples ($P < 0.05$) by Tukey test; $n = 3$.

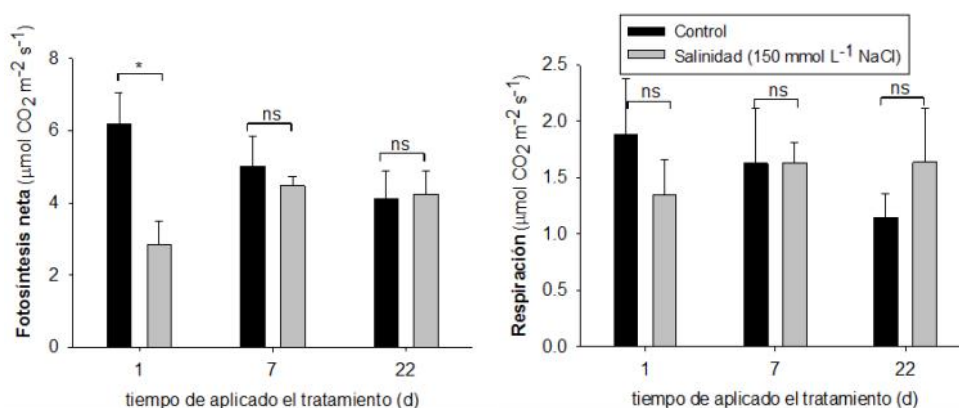


Figura 2. Asimilación de CO₂ (A) y actividad respiratoria (B) en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* 'Criollo'98') de plantas bajo condiciones de estrés salino (150 mmol L⁻¹ NaCl). Los datos son mostrados como la media de 3 réplicas \pm desviación estándar. * Indica diferencias significativas entre las muestras (indicadas por los corchetes) por una prueba t al nivel de $P < 0,05$; ns: diferencias no significativas.

Figure 2. CO₂ assimilation (A) and respiratory activity (B) in tobacco (*Nicotiana tabacum* 'Criollo'98') leaves from plants under salt stress conditions (150 mmol L⁻¹ NaCl). Data are shown as means of the three replicates \pm SD. *Indicates a significant difference of pairs by t-test indicated by brackets at a level of $P < 0.05$; ns: no significant difference.

apertura de los estomas. Independientemente de la hora del día, la apertura estomática fue menor en plantas bajo condiciones de salinidad comparado con las plantas control (Fig. 3 B).

Las plantas control tuvieron una mayor apertura estomática en horas tempranas de la mañana. Las plantas bajo condiciones de salinidad tuvieron un área del poro estomático dos veces más pequeño que las plantas control en la mañana y no cambió el grado de apertura estomática durante el resto del día.

Los niveles de clorofila y carotenoides, calculados por área foliar, incrementaron en plantas bajo condiciones de salinidad (Fig. 4 A, B). El incremento fue significativo después de 15 d de tratamiento. Después de 22 d de mantenerse las plantas bajo condiciones de salinidad, el contenido de clorofilas y carotenoides fue alrededor de un 33 % y un 25 % mayor que en plantas control, respectivamente.

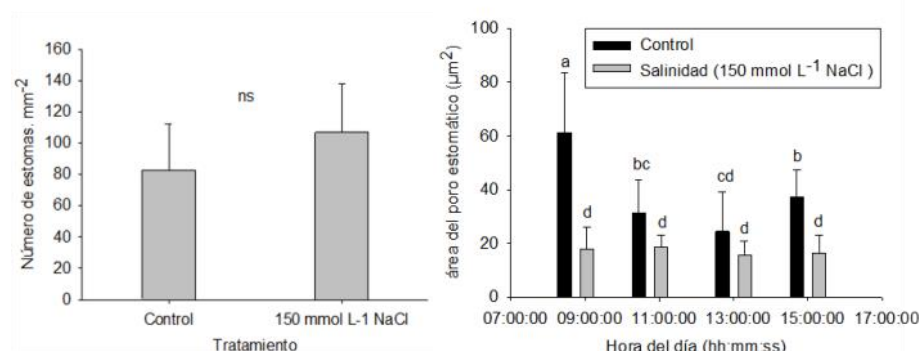


Figura 3. Efecto de la salinidad en la densidad estomática de las hojas (A) y área del poro estomático (B) de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* 'Criollo'98') a diferentes horas del día después de 20 d de tratamiento salino (150 mmol L⁻¹ NaCl). Barras, desviación estándar; diferentes letras denotan diferencias significativas entre las muestras ($P < 0,05$) por una prueba t en A y por prueba Tukey en B; $n = 18$; ns: diferencias no significativas.

Figure 3. Salinity effect on the density of guard cells per leaf are (A) and the area of the stomatal pore (B) of tobacco (*Nicotiana tabacum* 'Criollo'98') plants at different times after 20 d of saline treatment (150 mmol L⁻¹ NaCl). Bars, standard deviation; different letters denote significant difference between samples ($P < 0.05$) by t-test in A and by Tukey test in B; $n=18$; ns: no significant difference.

Los tejidos foliares de plantas de tabaco mostraron mayor porcentaje de salida de electrolitos después de 52 h de tratamiento salino ($21,4 \pm 1,3$) con respecto a las plantas del tratamiento control ($12,0 \pm 1,9$); sin embargo, el contenido de MDA no cambió comparado con el control excepto después de 6 h de tratamiento (Fig. 5). La presencia de MDA (Anbusrinivasan *et al.* 2009), un producto secundario final de la oxidación de ácidos grasos poli-insaturados, es considerado un indicador útil para la oxidación de lípidos en general.

La actividad de la enzima Guaiacol peroxidasa (GPX) medida en las plantas tratadas y las plantas control mostraron diferencias no significativas después de una hora de estrés salino en las plantas de tabaco. Después de 3 h de tratamiento hubo un incremento en la actividad GPX en los tejidos de las plantas estresadas, alcanzando valores dos veces mayores que en las plantas control.

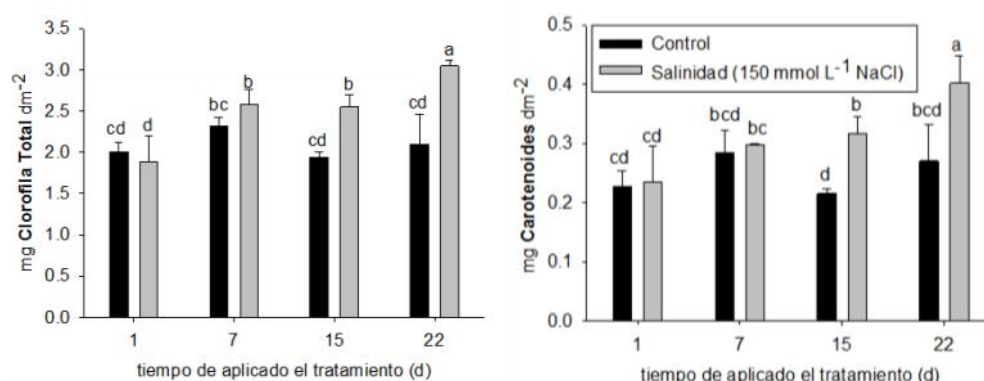


Figura 4. Contenido de clorofila (A) y carotenoides (B) en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* 'Criollo'98') bajo condiciones de salinidad (150 mmol L⁻¹ NaCl). Barras, desviación estándar; diferentes letras denotan diferencias significativas entre las muestras ($P < 0,05$) por prueba Tukey; $n = 3$.

Figure 4. Chlorophyll (A) and carotenoids (B) content in tobacco (*Nicotiana tabacum* 'Criollo'98') plants under saline conditions (150 mmol L⁻¹ NaCl). Bars, standard deviation; different letters mean a significant difference among samples ($P < 0.05$) by Tukey test; $n = 3$.

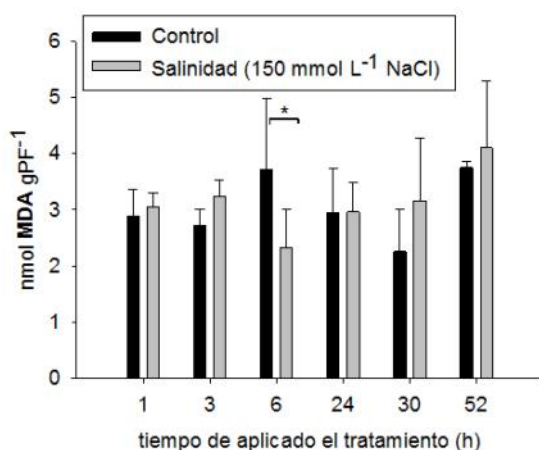


Figura 5. Contenido de MDA en tejidos foliares (hoja No 4) de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* 'Criollo'98') bajo condiciones de salinidad (150 mmol L⁻¹ de NaCl) y control. Los datos son mostrados como la media de 3 réplicas \pm desviación estándar; * Diferencias significativas.

Figure 5. MDA content in leaf (No 4) tissue of tobacco (*Nicotiana tabacum* 'Criollo'98') plants under saline (150 mmol L⁻¹ de NaCl) and control conditions. Data are means of three biological replica \pm SD; * Indicates a significant difference from control by t-test at the level of $P < 0.05$.

La diferencia fue mantenida a las seis y 24 horas del tratamiento del estrés pero después de 52 h la actividad GPX disminuyó en plantas en condiciones de salinidad, alcanzando valores similares al control (Fig. 6 A).

La actividad de la enzima catalasa en tejido foliar de las plantas tratadas fue mayor que en las plantas control después de una hora de tratamiento salino (Fig. 6 B) alcanzando valores tres veces mayores que el control. La actividad de esta enzima disminuyó con el tiempo hasta que alcanzó el valor obtenido en las plantas control a las seis horas. Después de 52 h la actividad catalasa incrementó nuevamente.

Después de una hora de tratamiento salino, la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en tejidos foliares de las plantas tratadas fue tres veces menor que en plantas control (Fig. 6 C). La actividad SOD, de plantas estresadas, continuamente incrementó desde 3h después de comenzar el tratamiento y alcanzó valores similares que las muestras controles.

DISCUSIÓN

La homeostasis redox celular bajo condiciones de estrés requiere las respuestas coordinadas de efectores del estrés que inducen modificaciones en la actividad de proteínas y expresión génica por múltiples redes de señalización. Numerosos cambios a diferentes niveles ocurrieron en las plantas de tabaco durante el estrés abiótico aplicado en este trabajo; esto abarcó desde modificaciones morfológicas, hasta bioquímicas y fisiológicas. Estos cambios incluyen una repuesta temprana al estrés mediante cierre estomático, modificaciones de la fotosíntesis, cambios en el contenido

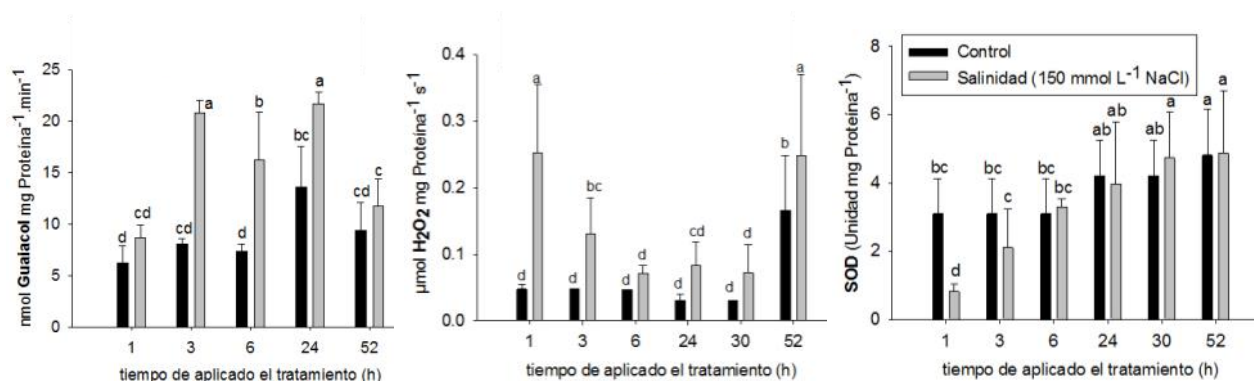


Figura 6. Actividad de enzimas antioxidantes en hojas de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* 'Criollo'98') bajo condiciones de salinidad (150 mmol L⁻¹ de NaCl) y control medidas a varios tiempos después de aplicado el estrés. Actividad guaiacol peroxidasa A), catalasa B) y superóxido dismutasa C). Barras, desviación estándar; diferentes letras denotan diferencias significativas entre las muestras ($P < 0.05$) por prueba Tukey; $n = 9$.

Figure 6. Activity of antioxidant enzymes in leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum* 'Criollo'98') plants under saline (150 mmol L⁻¹ de NaCl) and control conditions measured at several time point of the onset of stress. A) Guaiacol peroxidase, B) catalase and C) superoxide dismutase activities. Bars, standard deviation; different letters mean significant difference between samples ($P < 0.05$) by Tukey test; $n = 9$.

de pigmentos y respuestas de protección antioxidante para eliminar eficientemente las posibles EROs producidas.

Aplicando sal a las plantas de tabaco creciendo en condiciones de hidroponía, el potencial de agua de la solución Hoagland fue de 0,66 MPa menor que el control (solución Hoagland sin sal). La reducción del área foliar y la producción de biomasa de plantas de tabaco sujetas a condiciones de salinidad (Fig. 1) fue una consecuencia de la poca disponibilidad de agua debido a un incremento del contenido de sal en la solución nutritiva, y la reducción de su potencial osmótico. En condiciones de salinidad, además del estrés hídrico, las plantas sufren toxicidad debido al exceso intracelular de Na⁺ y Cl⁻ (Buchanan *et al.* 2015).

El bajo potencial de agua alcanzado durante el estrés hídrico y salino provoca que la célula se contraiga y la presión de turgencia hacia la pared celular disminuya. Las actividades dependientes de turgencia, tales como la expansión celular y la elongación de las raíces son más sensibles al déficit de agua. La inhibición de la expansión celular resulta en un retraso de la expansión de la hoja en condiciones de déficit de agua (Taiz y Zeiger 2006). Además, como el contenido de agua disminuye, el proceso de emergencia de la hoja en el meristemo es afectado (Tichá *et al.* 1995). Así, la deficiencia de agua disminuye la formación de tejido fotosintético. Bajo estrés salino/hídrico, señales químicas incluido el ácido abscísico (ABA) y las citoquininas originadas en la raíz, son transportadas a través del xilema hacia la hoja lo que unido a cambios en el pH, provocan el cierre estomático (Schachtman y Goodger 2008). Las respuestas de cierre estomático durante etapas de poca disponibilidad de agua en el suelo resultan en menos producción de biomasa. Los presentes resultados muestran un menor incremento del área foliar y la biomasa en similar proporción durante el tratamiento salino (Fig. 1). La reducción del área foliar es una respuesta de aclimatación a condiciones de estrés que contribuye a evitar una posible desecación, pero representa un compromiso para la toma de luz y CO₂, provocando una menor síntesis y distribución de foto-asimilados y acumulación de biomasa en las plantas.

El proceso de asimilación de dióxido de carbono fue afectado en las plantas de tabaco después de 24 h de que fue aplicado el tratamiento salino, sin embargo, los valores de fotosíntesis neta fueron similares a las plantas no estresadas después de 7 y 22 d de aplicado el estrés (Fig. 2). Esto es una evidencia de aclimatación

a condiciones desfavorables. A pesar del recobrado de la actividad fotosintética después de 7 d de estrés, los valores bajos de fotosíntesis obtenidos después de 24 h de estrés tuvieron consecuencias en el área foliar fotosintéticamente activa y en la producción de biomasa por planta (Fig. 1). El efecto en la asimilación de CO₂ pudo estar relacionado en primera instancia con un cierre estomático. La alcalinización en la savia xilemática inducida por el estrés hídrico, puede funcionar como una señal de la raíz que promueve el cierre estomático temprano, trayendo una disminución de la pérdida de agua por transpiración y un incremento de la eficiencia del uso del agua (Schachtman y Goodger 2008). El mantenimiento de la densidad estomática después de 20 d de estrés salino (Fig. 3) se debe a que el conteo de los estomas por área se realizó en hojas que ya estaban formadas en el momento de aplicado el estrés. La disminución de la fijación fotosintética de CO₂ observada durante las primeras horas de estrés (Fig. 2) pudiera estar relacionado con el cierre estomático, pero después de 7 y 20 d bajo condiciones de estrés salino las plantas lograron mantener similar actividad de fijación fotosintética comparada con el control, a pesar de que las células oclusivas estaban más cerradas que el control aunque mantuvieron una pequeña área del poro abierta (Fig. 3). Una mayor eficiencia fotosintética pudiera ser la razón de este resultado. La tolerancia del fotosistema II (PS II) a la salinidad y a la baja iluminación es una estrategia de las plantas para sobrevivir a estas condiciones de estrés según proponen Jamil *et al.* (2007).

En contraste con la fotosíntesis, la tasa respiratoria no cambió durante los experimentos de salinidad (Fig. 2). Previamente, otros autores observaron que durante el estrés hídrico, los cambios en la actividad respiratoria fueron más pequeños que en la fotosíntesis (Collén *et al.* 2013). La respiración comienza a comprometerse bajo condiciones de estrés cuando la fotosíntesis es fuertemente afectada (Ribas-Carbo *et al.* 2005). Bajo condiciones de estrés hídrico en soya (*Glycine max* L.), un incremento de la actividad de la oxidasa alternativa (AOX) y una disminución de la actividad citocromo oxidasa COX) tienden a balancear la respiración total (Ribas-Carbo *et al.* 2005); sin embargo, la reducción de la respiración total, en *Nicotiana sylvestris* Speg. & Comes, durante el estrés hídrico es predominantemente debido a una reducción en la actividad COX, mientras que la actividad AOX permanece casi inalterada (Galle *et al.* 2010). En el presente experimento, una proporción de cada vía respiratoria

(COX y AOX) pudiera ser afectada por el estrés, pero esto no fue investigado. Bajo diferentes condiciones de estrés, las plantas necesitan dedicar una gran cantidad de energía para preservar las funciones vitales (respiración de mantenimiento) y menos energía para el crecimiento y procesos biosintéticos (respiración de crecimiento) (Thornley 1970; 1977). Una tasa de respiración inalterada y la aclimatación en la tasa fotosintética durante el estrés salino contribuyó al mantenimiento de las funciones vitales en las plantas de tabaco. El incremento en el contenido de clorofila por área foliar, pudiera haber contribuido a la aclimatación en la fotosíntesis observada después de 22 días de estrés salino. Sin embargo, no solo las clorofilas, sino también los pigmentos accesorios como los carotenoides, incrementaron después de 15 y 22 d después del tratamiento salino (Fig. 4).

El contenido de clorofila de las hojas bajo estrés salino tiene una respuesta de inhibición/estimulación que varía de acuerdo al cultivar, tiempo de exposición y concentración de sales. Hay un patrón diferente en la acumulación de pigmentos en cultivares sensibles y resistentes; los cultivares con menores afectaciones en el contenido de pigmentos tienen mayor protección bajo estrés salino (Misra *et al.* 1997; Doganlar *et al.* 2010).

Un incremento en el contenido de clorofila en condiciones de salinidad se ha vinculado con un aumento en el número de cloroplastos (Aldesuquy 1992). Un incremento en el volumen de cloroplastos en hojas de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) fue obtenido en condiciones de 200 mmol L⁻¹ NaCl (Robinson *et al.* 1983). En *N. tabacum* no se ha encontrado ningún informe previo de cambios del contenido de clorofilas en condiciones de estrés salino. Un aumento en el contenido de clorofila después de un estrés a largo plazo también pudiera estar asociado con la inhibición de su degradación. El catabolismo inicial de la clorofila ocurre a un nivel de recambio basal durante la senescencia de la hoja y la maduración de los frutos (Eckhardt *et al.* 2004). Este proceso está también asociado con una mayor actividad del mecanismo de defensa frente a la degradación peroxidativa de la clorofila, conocida como "bleaching", en hojas jóvenes (Kato y Shimizu 1987) y menor degradación de la clorofila. Menos degradación, unida a no afectación de su síntesis puede explicar el incremento de clorofila total encontrada en el experimento conducido.

En plántulas de la familia Cucurbitaceae (*Cucurbita pepo* L. y *Cucurbita moschata* Duch.) en condiciones

de estrés salino, la degradación de la clorofila es evitada por una alta protección antioxidante (Sevengor *et al.* 2011). Plantas de *N. tabacum* con el gen que codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) silenciado fueron susceptibles y mostraron mayor degradación de la clorofila total en condiciones de estrés hídrico; sugiriendo el papel de la ADH en la protección de la maquinaria fotosintética en condiciones de estrés (Senthil-Kumar *et al.* 2010). Sin embargo, el papel de la ADH confirmando tolerancia al estrés es desconocido. En conocimiento de los autores, no existe otro informe en el cual la baja degradación del contenido de clorofila esté relacionada con una alta protección antioxidante durante el estrés abiótico en plantas de tabaco. Una red compleja de reacciones enzimáticas y moléculas antioxidantes controlan las concentraciones de especies reactivas de oxígeno (EROs) y reparan el daño oxidativo (Willekens *et al.* 1997; Noctor y Foyer 1998; Young y Lowe 2001; Greene 2002; Reddy y Raghavendra 2006).

La salinidad es uno de los factores que puede promover la formación de EROs y provocar en las plantas estrés oxidativo (Wang *et al.* 2004). El estrés oxidativo puede causar afectaciones en la integridad y permeabilidad selectiva de las membranas celulares. Un parámetro usado frecuentemente para evaluar el impacto del estrés sobre la estabilidad de las membranas es el eflujo de electrolitos (Campos *et al.* 2003; Kocheva *et al.* 2009; Zhang y Wu 2009; Dong *et al.* 2013). Los resultados actuales indican que el tratamiento salino provocó una marcada afectación sobre la funcionalidad de las membranas celulares, ya que el eflujo de electrolitos (expresado en %) fue el doble en las plantas de tabaco bajo estrés comparadas con el control.

El incremento en las concentraciones de MDA, uno de los productos finales de la peroxidación lipídica, también constituye un indicador del estrés oxidativo junto al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Kocheva *et al.* 2009; Abogadallah 2011). En las plantas de tabaco sometidas a 150 mmol L⁻¹ de NaCl no se encontró, en general, variaciones significativas en el contenido de equivalentes de MDA con respecto al control en las mediciones realizadas (Fig. 5) excepto a las 6 h de tratamiento; lo que difiere por completo con el porcentaje de eflujo de electrolitos en dichas plantas.

Ante diferentes condiciones desfavorables como estrés hídrico y bajas temperaturas, se ha observado en plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y pepino (*Cucumis sativus* L.) respectivamente, un incremento

tanto en el eflujo de electrolitos como en la concentración de MDA (Kocheva *et al.* 2009; Dong *et al.* 2013). Sin embargo, Campos *et al.* (2003) no encontraron una correspondencia entre eflujo de electrolitos y producción de MDA en algunas variedades de café (*Coffea* sp.) luego de ser sometidas a estrés por bajas temperaturas. Estos autores sugieren que en las plantas donde los cambios en el contenido de MDA no fueron significativos, existen eficientes mecanismos antioxidantes que pueden evitar la peroxidación lipídica.

Cambios transitorios en la actividad de las enzimas GPX, CAT y SOD observados en hojas de tabaco (Fig. 6) como una consecuencia del estrés salino durante los primeros dos muestreos, sugiere un mecanismo rápido en respuesta a la producción de EROs.

Los incrementos en las actividades de las enzimas CAT y GPX en condiciones de estrés salino (Fig. 6) están en concordancia con su posible función en cooperación para eliminar el contenido de H_2O_2 . Como la catalasa tiene una velocidad máxima superior a las peroxidasas, remueve la mayoría del peróxido mientras que las peroxidasas reducen el resto (Willekens *et al.* 1997). Esto es indiscutiblemente dependiente del compartimento celular en el cual el H_2O_2 es generado. El H_2O_2 no está estrictamente compartimentado y es capaz de difundir libremente a través de las membranas (Willekens *et al.* 1997).

La disminución de la actividad total SOD en la primera hora del experimento pudiera parecer contradictorio con la consideración de que esta enzima es la primera línea de defensa frente a EROs como reportó Alscher *et al.* (2002), removiendo superóxido (O_2^-) del sitio de generación. El O_2^- es reducido a H_2O_2 el cual a su vez es reducido a H_2O por las enzimas catalasa y peroxidasas (Thannickal y Fanburg 2000).

Una baja actividad SOD bajo condiciones de salinidad pudiera evitar la formación de niveles tóxicos de H_2O_2 en esta situación. Las plantas han desarrollado un sistema de defensa en contra de EROs, que involucra tanto una producción limitada de EROs como su eliminación (Alscher *et al.* 2002).

El incremento en la actividad de GPX y CAT en plantas de tabaco bajo condiciones de estrés salino (Fig. 6) indica que las concentraciones de H_2O_2 en la célula incrementaron en estas condiciones desfavorables. Pero la baja actividad SOD indica que el H_2O_2 no fue originado de la dismutación de O_2^- en estas condiciones experimentales. El H_2O_2 es también generado

durante el transporte de electrones en la mitocondria, en el proceso de fotorrespiración en los peroxisomas y en la β -oxidación de los ácidos grasos en los glioxisomas. Los niveles celulares de este metabolito están determinados por la tasa de producción y la actividad de las enzimas antioxidantes que lo eliminan (Neill *et al.* 2002).

El incremento de la fotorrespiración en condiciones de estrés salino pudiera prevenir la formación de EROs en los cloroplastos (Chaves *et al.* 2009; Maurino y Peterhansel 2010; Miller *et al.* 2010) y así, proteger el PS II de daños (Hershbach *et al.* 2010). Así la fotorrespiración es un componente importante del proceso involucrado en la disminución de la producción de EROs (disipando el exceso de equivalentes de reducción así como de energía), aunque el mismo sea una fuente de producción de H_2O_2 , involucrado también en la transducción de señales durante el estrés (Voss *et al.* 2013). El incremento del contenido de H_2O_2 en plantas de tabaco durante el estrés salino, inferido a partir de la alta actividad GPX y CAT (Fig. 6), puede estar relacionado con un incremento de la fotorrespiración.

Los resultados de este trabajo evidencian la aclimatación de las plantas de tabaco del cultivar 'Criollo'98', a las condiciones de salinidad del orden de 150 mmol L^{-1} NaCl, lo que fue facilitado por el control de la apertura estomática sin afectación de la actividad fotosintética; la regulación de la razón de biomasa vástago:raíz que le permite a la planta utilizar mejor los niveles de humedad del suelo y el control de la aparición de especies reactivas de oxígeno en los tejidos.

LITERATURA CITADA

- Abogadallah, G. M. (2011) Differential regulation of photorespiratory gene expression by moderate and severe salt and drought stress in relation to oxidative stress. *Plant Science* 180: 540-547
- Abramoff, M. D., P. J. Magelhaes y S. J. Ram (2004) Image processing with Image J. *Biophotonics International* 11: 36-42
- Aldesuquy, H. S. (1992) Growth and pigment content of wheat as influenced by the combined effects of salinity and growth regulators. *Biologia Plantarum* 34: 275-283
- Alscher, R. G., N. Erturk y L. S. Heath (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxida-

- tive stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341
- Anbusrinivasan, P., G. Madhurambal y S. C. Mojumdar (2009) p-N,N-Dimethylaminobenzaldehyde (DAB) grown by solution technique using as growth medium. Thermal studies and spectral characterization. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 96: 111-115
- Borges, A., R. Morejón, A. Izquierdo, L. Monzón, E. Ortega, *et al.* (2012) Nitrogen fertilization for optimizing the quality and yield of shade grown cuban cigar tobacco: required nitrogen amounts, application schedules, adequate leaf nitrogen levels, and early season diagnostic tests. *Contributions to Tobacco Research* 25: 336-349
- Boyer, J. S. (1970) Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean, and sunflower at various leaf water potentials. *Plant Physiology* 46: 233-235
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Buchanan, B. B., W. Gruissem y R. L. Jones, (Eds). (2015) *Biochemistry and molecular biology of plants*. Oxford-West Sussex-Hoboken, Wiley Blackwell. 1206 pp
- Campos, P. S., V. Quartin, J. C. Ramalho y M. A. Nunes (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Journal of Plant Physiology* 160: 283-292
- Collén, J., B. Porcel, W. Wilfrid Carré, S. Steven G. Ballg, C. Cristian Chaparro, *et al.* (2013) Genome structure and metabolic features in the red seaweed *Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida. *Proceedings of National Academy of Sciences* 110: 5247-5252
- Czarnecki, O., E. Peter y B. Grimm (2011) Methods for analysis of photosynthetic pigments and steady-state levels of intermediates of tetrapyrrole biosynthesis. *Chloroplast Research in Arabidopsis: Methods and Protocols*, Jarvis, R. P., Springer Science+Business Media. II: 357-385 pp
- Chaves, M. M., J. Flexas y C. Pinheiro (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103: 551-560
- Doganlar, Z. B., K. Demir, H. Basak y I. Gul (2010) Effects of salt stress on pigment and total soluble protein contents of three different tomato cultivars. *African Journal of Agricultural Research* 5: 2056-2065
- Dong, X., H. Bi, G. Wu y X. Ai (2013) Drought-induced chilling tolerance in cucumber involves membrane stabilisation improved by antioxidant system. *International Journal of Plant Production* 7: 67-80
- Eckhardt, U., B. Grimm y S. Hortensteiner (2004) Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. *Plant Molecular Biology* 56: 1-4
- Espino, E. y G. Torrecilla (1999) *El tabaco cubano. Recursos Fitogenéticos*. La Habana, Editorial Científico-Técnica. 230 pp
- Galle, A., I. Florez-Sarasa, A. Thameur, R. de Paepe, J. Flexas, *et al.* (2010) Effects of drought stress and subsequent rewatering on photosynthetic and respiratory pathways in *Nicotiana sylvestris* wild type and the mitochondrial complex I-deficient CMSII mutant. *Journal of Experimental Botany* 61: 765-775
- González-Núñez, L. M., T. Tóth y D. García (2004) Integrated management for the sustainable use of salt-affected soil in Cuba. *Universidad y Ciencia* 20: 85-102
- Greene, R. (2002) Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. *The Arabidopsis book*. 1.
- Gulen, H. y A. Eris (2004) Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Science* 166: 739-744
- Hershbach, C., M. Teuber, M. Eiblmeier, B. Ehrling, P. Ache, *et al.* (2010) Changes in sulphur metabolism of grey poplar (*Populus x canescens*) leaves during salt stress: a metabolic link to photorespiration. *Tree Physiology* 30: 1161-1173
- Hoagland, D. R. y D. I. Arnon (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347: 1-32
- Hodges, D. M., J. M. DeLong, C. F. Forney y R. K. Prange (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604-611

- Holmström, K.-O., S. Somersalo, A. Mandal, T. E. Palva y B. Welin (2000) Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *Journal of Experimental Botany* 51: 177-185
- Jamil, M., S. Rehman y E. S. Rha (2007) Salinity effect on plant growth, PSII photochemistry and chlorophyll content in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and cabbage (*Brassica oleracea capitata* L.). *Pakistan Journal of Botany* 39: 753-760
- Kato, M. y S. Shimizu (1987) Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation. *Canadian Journal of Botany* 65: 729-735
- Kocheva, K. V., T. Kartseva, S. Landjeva y G. I. Georgiev (2009) Physiological response of wheat seedlings to mild severe osmotic stress. *Cereal Research Communications* 37: 199-208
- Maurino, V. G. y C. Peterhansel (2010) Photorespiration: current status and approaches for metabolic engineering. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 248-255
- Miller, G., N. Suzuki, S. Ciftci-Yilmaz y R. Mittler (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment* 33: 453-467
- Misra, A. N., S. M. Sahu, M. Misra, P. Singh, I. Meera, *et al.* (1997) Sodium chloride induced changes in leaf growth, and pigment and protein contents in two rice cultivars. *Biologia Plantarum* 39: 257-262
- Neill, S., R. Desikan y J. Hancock (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 388-395
- Noctor, G. y C. H. Foyer (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279
- Palta, J. P., J. Levitt y E. J. Stadelmann (1977) Freezing injury in onion bulb cells. I. Evaluation of the conductivity method and analysis of ion and sugar efflux from injured cells. *Plant Physiology* 60: 393-397
- Penna, S. (2003) Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants. *Trends in Plant Science* 8: 355-357
- Porra, R. J., W. A. Thompson y P. E. Kriedemann (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equation for assaying chlorophyll a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 975: 384-394
- Reddy, A. R. y A. S. Raghavendra (2006) Photooxidative stress. *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Rao, K. V. M., *et al.* Netherlands, Springer: 157-186 pp
- Ribas-Carbo, M., N. L. Taylor, L. Giles, S. Busquets, P. M. Finnegan, *et al.* (2005) Effects of water stress on respiration in soybean leaves. *Plant Physiology* 139: 466-473
- Robinson, S. P., W. J. S. Downton y J. A. Millhouse (1983) Photosynthesis and ion content of leaves and isolated chloroplasts of salt-stressed spinach. *Plant Physiology* 73: 238-242
- Roháček, K., J. Soukupová y M. Barták (2008) Chlorophyll fluorescence: A wonderful tool to study plant physiology and plant stress. *Plant Cell Compartments*
- Schachtman, D. P. y J. Q. Goodger (2008) Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science* 13: 281-287
- Senthil-Kumar, M., R. Hema, T. R. Suryachandra, H. V. Ramegowda, R. Gopalakrishna, *et al.* (2010) Functional characterization of three water deficit stress-induced genes in tobacco and Arabidopsis: An approach based on gene down regulation. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 35-44
- Sevengor, S., F. Yasar, S. Kusvuran y S. Ellialtioglu (2011) The effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidative enzymes of pumpkin seedling. *African Journal of Agricultural Research* 6: 4920-4924
- Sharma, P., R. Bhardwaj, N. Arora y H. K. Arora (2007) Effect of 28-homobrassinolide on growth, Zn metal uptake and antioxidative enzyme activities in *Brassica juncea* L. seedlings. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19: 203-210
- Sung, F. J. M. y D. R. Krieg (1979) Relative sensitivity of photosynthetic assimilation and translocation of ¹⁴Carbon to water stress. *Plant Physiology* 64: 852-856

- Taiz, L. y E. Zeiger (2006) *Plant Physiology*. Massachusetts, Sinauer Associates, Inc. 764 pp
- Thannickal, V. J. y B. L. Fanburg (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 279: L1005-L1028
- Thornley, J. H. M. (1970) Respiration, growth and maintenance in plants. *Nature* 227: 304-305
- Thornley, J. H. M. (1977) Growth, maintenance and respiration: a re-interpretation. *Annals of Botany* 41: 1191-1203
- Tichá, I., J. Catsky, D. Hodánova, J. Pospisilová, M. Kase, *et al.* (1995) Gas exchange and dry matter accumulation during leaf development. *Photosynthesis during leaf development*. Praha, Academia Praha. 396 pp
- Tuteja, N. (2005) Unwinding after high salinity stress: Development of salinity tolerant plant without affecting yield. *ISB News Report*
- Voss, I., B. Sunil, R. Scheibe y A. S. Raghavendra (2013) Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. *Plant Biology* 15: 713-722
- Wang, B., U. Lüttge y R. Ratajczak (2004) Specific regulation of SOD isoforms by NaCl and osmotic stress in leaves of the C3 halophyte *Suaeda salsa* L. *Journal of Plant Physiology* 161: 285-293
- Weyers, J. D. B. y L. G. Johansen (1985) Accurate estimation of stomatal aperture from silicone rubber impressions. *New Phytologist* 101: 109-115
- Willekens, H., S. Chamnongpol, M. Davey, M. Schraudner, C. Langebartels, *et al.* (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO Journal* 16: 4806-4816
- Young, A. J. y G. M. Lowe (2001) Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385: 20-27
- Zhang, J.-Y. y F.-Z. Wu (2009) Effects of salt stress on chlorophyll content and chloroplast ultra-structure of different salt-tolerant cucumber varieties. 1: 13-16
- Zhang, J., Y. Zhang, Y. Du, S. Chen y H. Tang (2011) Dynamic metabonomic responses of Tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants to salt stress. *Journal of Proteome Research* 10: 1904-1914



Editor para correspondencia: Dr. Dennis Denis Ávila