



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



Centro Universitario UAEM Tenancingo

**EFFECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA TOLERANCIA A ESTRÉS
SALINO EN MICROPLANTAS DE CRISANTEMO (*Dendranthema
grandiflora* Tzvelev) VARIEDAD POLARIS WHITE.**

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA

PRESENTA:

JUAN MANUEL FUENTES AYÓN

Directora

Dra. Marta Elena Mora Herrera

Tenancingo, Estado de México, diciembre de 2014



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO

Tenancingo, Estado de México; 20 de noviembre de 2014.

**JUAN MANUEL FUENTES AYÓN
PASANTE DE LA LICENCIATURA DE
INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA
P R E S E N T E**

Por este conducto comunico a Usted, que con base en el Reglamento de Facultades y Escuelas Profesionales de la UAEM que en su Capítulo VIII artículo 120, 121 y 122, así como el Reglamento de Opciones de Evaluación Profesional de la UAEM Capítulo I artículo 6º, puede proceder a realizar la elaboración en formato electrónico del trabajo de Tesis, **“Efecto del ácido salicílico en la tolerancia a estrés salino en microplantas de crisantemo (Dendranthema grandiflora Tzvelev) variedad polaris White”** y continuar con los trámites y requisitos requeridos para efecto de poder sustentar su examen profesional y obtener el título de **LICENCIADO EN INGENIERO AGRÓNOMO EN FLORICULTURA.**

Sin otro particular, quedo a sus apreciables órdenes.

**Atentamente
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
“2014, 70 Aniversario de la Autonomía ICLA-UAEM”**

**DRA. LUZ MARÍA ROBLES HERNÁNDEZ
SUBDIRECTORA ACADÉMICA DEL CENTRO
UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO**



**Centro Universitario
UAEM Tenancingo**



C. c. p. Mtra. Gabriela Alejandra Ambrosio Arzate.- Encargada del Departamento de Evaluación Profesional.
C. c. p. Archivo
LMRH/vfr.



www.uaemex.mx



Tenancingo, México a 19 de noviembre 2014.

MARDYTA GABRIELA ALEJANDRA AMBROSIO ARZATE

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL

CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO

PRESENTE:

En mi calidad de directora de la tesis titulada: "Efecto del ácido salicílico en la tolerancia a estrés salino en microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white" que presenta el C. Juan Manuel Fuentes Ayón pasante de Ingeriero Agrónomo en Floricultura, informo que bajo mi supervisión se realizaron las correcciones sugeridas por los revisores, por lo cual ha concluido el proceso de escritura de dicho documento. Por lo que puede continuar con los tramites correspondientes.

Sin otro particular quedan de Usted.:

ATENTAMENTE

DRA. MARTHA ELENA MORA HERRERA

PTC EN EL CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO

c.c.p. Dra. Luz María Robles Hernández. Subdirectora Académica del CUT.

c.c.p Archivo



CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TENANCINGO, 06 NOVIEMBRE, 2014

MARDTYTA GABRIELA ALEJANDRA AMBROSIO ARZATE
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL

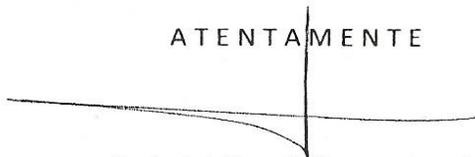
P R E S E N T E

En respuesta a su oficio con fecha 27 de octubre del año en curso, referente a la revisión del trabajo de tesis titulado "Efecto del ácido salicílico en tolerancia al estrés salino con NaCl sobre microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris White", cuyo autor es el c. Juan Manuel Fuentes Ayón, egresado de la Licenciatura de Ingeniero Agrónomo en Floricultura. El dictamen es **Aprobado con comentarios**. Felicito al autor por ser muy buen trabajo de licenciatura.

Se anexan comentarios sugerencias y correcciones.

Sin otro particular envío a usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE



Dr. Luis Miguel Vázquez García
PTC Centro Universitario UAEM Tenancingo

Los presentes comentarios, sugerencias y correcciones, tienen el propósito de mejorar el escrito **Efecto del ácido salicílico en la tolerancia al estrés salino con NaCl sobre microplantas de crisantemo (*Dendratema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris White.**

Título

Efecto del ácido salicílico en la tolerancia al estrés salino con NaCl sobre microplantas de crisantemo (*Dendratema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris White. Químicamente el cloruro de sodio es una sal, por ello sugiero que el título se modifique ligeramente y se quede: **Efecto del ácido salicílico en la tolerancia al estrés con NaCl sobre microplantas de crisantemo (*Dendratema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris White.**

Carátula y contenido

Ver sugerencias en el escrito.

Resumen

Tiene pequeños errores, ver documento.

Abreviaturas

Sugiero colocar como anexo posterior a bibliografía.

En dicho apartado falta colocar el significado de DTT y EDTA.

Introducción

Se hacen sugerencias en el escrito.

Antecedentes

En descripción del cultivo, sugiero cambiarlo a descripción de la planta; en ningún momento se describe el cultivo.

Dentro del primer párrafo se repite la descripción de las inflorescencias del crisantemo, sugiero resumir la descripción de la planta.

En el escrito se hacen otras observaciones con respecto al presente apartado.

Justificación

Se menciona que en la zona florícola se aplican grandes cantidades de agroquímicos y se asume que hay un aumento en la salinidad de suelos; no obstante, no se mencionan cifras de aplicación de productos por cultivo, superficie de crisantemo, zona florícola. Tampoco se cita cuales agroquímicos causan la salinidad. Sugiero fundamentar la justificación.

Materiales y métodos

Página 21. En evaluación de supervivencia, mencionar lo que se entiende por dicho término y citar de forma precisa la forma de evaluar.

Página 22. En efecto del NaCl en microplantas de crisantemo. (Modelo biológico). Se mezcla metodología y resultados. Sugiero mencionar el cómo se realizó? y el cómo se eligió el modelo.

Página 23 y 25. Esquema 1 y 2. Sugiero se realice un sólo esquema de flujo, colocando el nombre de las etapas, coincidiendo con los objetivos particulares.

Resultados y discusión

Página 34. Efecto del NaCl en la supervivencia de microplantas de crisantemo. Dentro del texto dice, se eligió el tratamiento de 100 mM de NaCl. Posteriormente cita, se determinó elegir el tratamiento de 150 mM de NaCl. Lo anterior se presta a confusión, sugiero tener más claridad.

Dentro de este apartado se hacen observaciones, sugerencias y correcciones dentro del escrito.

Conclusiones

En las conclusiones 2 y 5 pueden ser acompañadas de datos cuantitativos para ser precisas.

Se comprende que debe haber conclusiones generales; no obstante, sugiero que las conclusiones den respuesta a todos los objetivos particulares. No hay conclusiones referentes a CAT, APX, POX, H₂O₂....



Tenancingo, México a 11 de Noviembre de 2014.

L en G. GABRIELA ALEJANDRA AMBROSIO ARZATE
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN
PROFESIONAL DEL CU-UAEMEX TENANCINGO.

PRESENTE:

Aprovechando la oportunidad para saludarla y agradecerle por haberme considerado como revisor de la tesis titulada **“Efecto del ácido salicílico en la tolerancia al estrés salino con NaCl sobre microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris White”**, presentada por el egresado de la licenciatura de Ingeniero Agrónomo en Floricultura **Juan Manuel Fuentes Ayón** con número de cuenta **0825377**. Por este medio me permito comunicarle que el dictamen de dicho documento es **APROBADO CON COMENTARIOS**:

1. En el escrito existen algunos errores de escritura, se recomienda hacer los cambios en el escrito se indican
2. Checar que todas las citas estén en el apartado de bibliografía, porque faltan algunas citas en la bibliografía
3. Checar que la bibliografía este adecuadamente escrita de acuerdo con las normas

Sin más por el momento me despido de Usted.

A T E N T A M E N T E
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
“2014, 70 Aniversario de la Autonomía ICLA-UAEM”

DRA. ELIZABETH URBINA SÁNCHEZ
PTC DEL CU-TENANCINGO



“Intenta no volverte un hombre de éxito, sino un hombre de valor”.

Albert Einstein

DEDICATORIA

*“A **Dios** por darme la vida, la fuerza para seguir adelante y poder concluir una meta importante en mi vida.”*

A mis padres

Angélica Ayón Fuentes y Enrique Fuentes Vázquez, por su amor, trabajo, sacrificio, apoyo, consejos, desvelos y la confianza que me han brindado hasta este momento de mi vida, los AMO.

A mis hermanos que me han apoyado, me aconsejan a seguir adelante, Luz María, Elizabeth, Luis, José y Carmen.

A mi cuñado Cesar. *A mis cuñadas:* María e Irene.

A mis sobrinos: Cesar, Andrés, Monserrat, Brayan, José, Mayrin, Samuel, Lluvia, Michelle y Rafael, a todos y cada uno de ustedes.

Sé que jamás existirá una forma de agradecer una vida de lucha, sacrificio y esfuerzo constante, solo deseo que sientan que el objetivo logrado también es suyo que la fuerza que me ayudo a conseguirlo fue su incondicional apoyo, su forma de luchar fue mi ideal, su sacrificio mi aliento, y su esfuerzo constante la fuerza de mi voluntad.

.....GRACIAS.....

A mis abuelos, Margarito Fuentes y Anita Vázquez & Rafael Ayón y Margarita Fuentes, ya que son uno claros ejemplos a seguir.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario UAEM Tenancingo por ser mi casa de estudios y bríndame la oportunidad de realizar mis estudios de Licenciatura.

A todos y cada uno de los profesores que me brindaron sus conocimientos para poder culminar mis estudios de Licenciatura.

A la Dra. Martha Elena Mora Herrera, por el apoyo para la realización de este trabajo de investigación.

A mis amigos y compañeros de clase, ya que todos y cada uno de los momentos que vivimos juntos, no se olvidaran.

Un agradecimiento especial a mis amigas y compañeras Janet, Liz y Nohemí por sus motivaciones y ayuda en la realización de este trabajo de investigación.

A mi amigo Francisco Javier (Paco), gracias por tu amistad.

A mi amiga Ruth Hernández Cruz por las motivaciones y consejos que me has brindado.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	XII
ABREVIACIONES	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Generalidades del crisantemo.....	4
2.2. Descripción del crisantemo.....	4
2.3. Problemas en el cultivo de crisantemo.....	5
2.3.1. Factores abióticos.....	6
2.3.2. Estrés por salinidad.....	6
2.4. Estrés oxidativo.....	7
2.4.1 Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	8
2.4.2. Función del H ₂ O ₂ en las plantas.....	8
2.5. Mecanismos de defensa contra estrés.....	9
2.5.1. Antioxidantes enzimáticos.....	9
2.5.1.1. Sistema antioxidante enzimático.....	9
2.5.1.2. Catalasa (CAT).....	10
2.5.1.3. Peroxidasa (POX).....	11
2.5.1.4. Ascorbato Peroxidasa (APX).....	12
2.6. Mecanismos de defensa contra la salinidad.....	13
2.6.1. Osmoprotectores.....	13
2.6.1.1. Prolina.....	13
2.7. Ácido salicílico.....	14
2.7.1. Importancia del AS en las respuestas de estrés.....	14
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. OBJETIVOS	18
4.1. Objetivo general.....	18
4.2. Objetivos específicos.....	18
5. HIPÓTESIS	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS	20

6.1. Sitio experimental.....	20
6.2. Material biológico.....	20
6.2.1. Mantenimiento de microplanta.....	20
6.3. Medio de cultivo.....	20
6.3.1. Concentraciones de NaCl.....	21
6.3.2. Solución concentrada de ácido salicílico (AS).....	21
6.4. Evaluación de supervivencia.....	21
6.5. Descripción de los experimentos.....	22
6.5.1. Modelo de respuesta de microplantas de crisantemo a estrés osmótico.....	22
6.5.1.1. Efecto del NaCl en microplantas de crisantemo (Modelo biológico)...	22
6.5.2. Efecto del AS en microplantas expuestas a estrés osmótico.....	22
6.5.2.1. Microplantas tratadas con AS.....	22
6.5.3. Efecto de AS en las respuestas oxidativas y antioxidativas de microplantas expuestas a estrés osmótico.....	24
6.6. Técnicas empleadas.....	26
6.6.1. Cuantificación de la actividad enzimática de CAT.....	26
6.6.2. Cuantificación de la actividad enzimática de POX.....	27
6.6.3. Cuantificación de la actividad enzimática de APX.....	28
6.6.4. Cuantificación del contenido de proteína.....	29
6.6.5. Cuantificación del contenido de H ₂ O ₂	30
6.6.6. Cuantificación del contenido de prolina.....	31
6.6.7. Cuantificación del contenido de pigmentos fotosintéticos.....	32
6.5. Análisis de resultados.....	33
7. RESULTADOS Y DISCUSION.....	34
7.1. Modelo de respuesta de microplantas de crisantemo a estrés osmótico.	34
7.1.1. Efecto del NaCl en la supervivencia de microplantas de crisantemo....	34
7.1.2. Efecto del NaCl sobre el crecimiento de microplantas de crisantemo...	35
7.2. Efecto del AS en microplantas expuestas a estrés osmótico.....	39
7.2.1. Efecto de AS sobre microplantas de crisantemo.....	39
7.3. Efecto del pretratamiento de AS en microplantas de crisantemo	41

expuestas a estrés osmótico con NaCl.....	
7.4. Efecto del AS en microplantas de crisantemo en las respuestas oxidativas, antioxidativas, osmoprotectores y pigmentos fotosintéticos expuestas a NaCl.....	43
7.4.1. Efecto del pretratamiento de AS en la actividad enzimática de la CAT en microplantas de crisantemo expuestas a NaCl.....	43
7.4.2. Efecto del pretratamiento de AS en la actividad enzimática de la POX en microplantas de crisantemo expuestas a NaCl.....	45
7.4.3. Efecto del pretratamiento de AS en la actividad enzimática de la APX en microplantas de crisantemo expuestas a NaCl.....	46
7.4.4. Efecto del pretratamiento de AS en el contenido de H ₂ O ₂ de microplantas de crisantemo expuestas a NaCl.....	48
7.4.5. Efecto del pretratamiento de AS en el contenido de prolina en microplantas de crisantemo expuestas a NaCl.....	50
7.4.6. Efecto del pretratamiento de AS en el contenido de pigmentos fotosintéticos en microplantas de crisantemo expuestas a NaCl.....	52
8. CONCLUSIONES.....	55
9. RECOMENDACIONES.....	55
10. BIBLIOGRAFÍA.....	56
11. ANEXOS.....	71
Anexo 1. Preparación de soluciones madre del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962).....	71
Anexo 2. Preparación de medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962)...	73
Anexo 3. Reactivos.....	74
Anexo 4. Soluciones madre de AS.....	76
Anexo 5. Equipo.....	77
Anexo 6. Resumen en extenso del XVII Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas.....	78

INDICE DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Diagrama de flujo de la metodología empleada para condiciones <i>in vitro</i>	23
Esquema 2. Diagrama de flujo de la metodología empleada en la Etapa 1 y Etapa 2, para condiciones <i>in vitro</i>	25

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Pág.
Cuadro 1. Clasificación taxonómica del crisantemo (IAPT, 2011).....	4
Figura 1. Supervivencia de microplantas de Crisantemo (<i>Dendranthema grandiflora</i> Tzvelev) variedad Polaris white, incubadas en NaCl, después de 28±2 días. Los resultados son el promedio de 28 microplantas ± e.s. (*) diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$).....	35
Figura 2. Longitud de tallo de microplantas de Crisantemo (<i>Dendranthema grandiflora</i> Tzvelev) variedad Polaris white, incubadas en NaCl, después de 28±2 días. Los resultados son el promedio de 28 microplantas ± e.s. (*) diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$).	36
Figura 3. Longitud de raíz de microplantas de Crisantemo (<i>Dendranthema grandiflora</i> Tzvelev) variedad Polaris white, incubadas en NaCl, después de 28±2 días. Los resultados son el promedio de 28 microplantas ± e.s. (*) diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$).....	37
Figura 4. Número de hojas de microplantas de Crisantemo (<i>Dendranthema grandiflora</i> Tzvelev) variedad Polaris white, incubadas en NaCl, después de 28±2 días. Los resultados son el promedio de 28 microplantas ± e.s. (*) diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$).....	37

Figura 5. Peso fresco de microplantas de Crisantemo (<i>Dendranthema grandiflora</i> Tzvelev) variedad Polaris white, incubadas en NaCl, después de 28±2 días. Los resultados son el promedio de 28 microplantas ± e.s. (*) diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$).....	38
Figura 6. Longitud de tallo y raíz de microplantas de Crisantemo (<i>Dendranthema grandiflora</i> Tzvelev) variedad Polaris White, incubadas en diferentes concentraciones de AS.....	40
Figura 7. Desarrollo de raíces y hojas de microplantas de Crisantemo (<i>Dendranthema grandiflora</i> Tzvelev) variedad Polaris white, preincubadas en AS y trasplantadas en NaCl (150 mM): A) 0, B) 10^{-4} , C) 10^{-5} y D) 10^{-6} M de AS.....	42
Figura 8. Actividad enzimática de la CAT en microplantas de crisantemo (<i>Dendranthema grandiflora</i> Tzvelev) variedad Polaris white, cultivadas <i>in vitro</i> en MS con AS 0 y 10^{-5} M (Etapa 1), trasplantadas sin raíz a MS con NaCl 150 mM (Etapa 2). Los resultados son el promedio de 4 repeticiones, ±e.s. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$).....	44
Figura 9. Actividad enzimática de la POX en microplantas de crisantemo (<i>Dendranthema grandiflora</i> Tzvelev) variedad Polaris white, cultivadas <i>in vitro</i> en MS con AS 0 y 10^{-5} M (Etapa 1), trasplantadas sin raíz a MS con NaCl 150 mM (Etapa 2). Los resultados son el promedio de 4 repeticiones, ±e.s. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$).....	46
Figura 10. Actividad enzimática de la APX en microplantas de crisantemo (<i>Dendranthema grandiflora</i> Tzvelev) variedad Polaris white, cultivadas <i>in vitro</i> en MS con AS 0 y 10^{-5} M (Etapa 1), trasplantadas sin raíz a MS con NaCl 150 mM (Etapa 2). Los resultados son el promedio de 4	47

repeticiones, \pm e.s. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$).....

Figura 11. Contenido de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) en microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white, cultivadas *in vitro* en MS con AS 0 y 10^{-5} M (Etapa 1), trasplantadas sin raíz a MS con NaCl 150 mM (Etapa 2). Los resultados son el promedio de 4 repeticiones, \pm e.s. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$)..... 49

Figura 12. Contenido de prolina en hojas de microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white, cultivadas *in vitro* en MS con AS 0 y 10^{-5} M (Etapa 1), trasplantadas sin raíz a MS con NaCl 150 mM (Etapa 2). Los resultados son el promedio de 4 repeticiones, \pm e.s. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$)..... 51

Figura 13. Contenido de pigmentos fotosintéticos: A) Clorofila *a*, B) Clorofila *b*, C) Carotenoides + Xantofilas y D) Clorofila total de microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white, cultivadas *in vitro* en MS con AS 0 y 10^{-5} M (Etapa 1), trasplantadas sin raíz a MS con NaCl 150 mM (Etapa 2). Los resultados son el promedio de 4 repeticiones, \pm e.s. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$)..... 53

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Longitud de raíz y tallo, numero de hojas y peso fresco de microplantas de Crisantemo (<i>Dendranthema grandiflora</i> Tzvelev) variedad Polaris white, incubadas en AS.....	41
Tabla 2. Crecimiento en microplantas de Crisantemo (<i>Dendranthema grandiflora</i> Tzvelev) variedad Polaris white, preincubadas en AS, trasplantadas en 150 mm de NaCl.....	42

RESUMEN

El Estado de México es productor de ornamentales y hortalizas, lo que ha generado contaminación por el uso excesivo de agroquímicos y fertilizantes, y la utilización de agua de riego de mala calidad, lo que aumenta salinidad, provocando a la planta la dificultad de absorber agua y nutrientes. Existen estudios encaminados a investigar la tolerancia al estrés biótico y/o abiótico, a través de la utilización de moléculas señal como el ácido salicílico (AS). Estudios recientes han demostrado que el AS participa en los procesos fisiológicos de la planta, como la inducción de tolerancia a factores de estrés salino. Por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del AS en la tolerancia a estrés salino en microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white.

Se utilizaron microplantas de crisantemo, para evaluar el efecto del AS en la tolerancia al estrés salino por cloruro de sodio (NaCl). Primero se estableció el modelo de respuesta al NaCl en microplantas, de acuerdo a la supervivencia y parámetros de crecimiento. De aquí se determinó utilizar 150 mM de NaCl en los subsecuentes experimentos. Los resultados indicaron que las microplantas de crisantemo son altamente tolerantes al NaCl.

Después se evaluó el efecto del AS sobre las microplantas de crisantemo, donde se encontró que la concentración 10^{-5} M de AS favorece la tolerancia a la salinidad.

En las plantas pretratadas con AS (Etapa 1) y trasplantadas a 150 mM de NaCl (Etapa 2). Se cuantificó la actividad enzimática de catalasa (CAT), peroxidasa (POX) y ascorbato peroxidasa (APX) y el contenido de H_2O_2 , prolina, y pigmentos fotosintéticos, estas cuantificaciones se realizaron en las dos etapas. Se observaron tendencias al incremento de la actividad enzimática por efecto de AS, mientras que, prolina incremento, el contenido de H_2O_2 decremento en los tratamientos con AS.

ABREVIATURAS

¹O₂ oxígeno en estado singulete

AA ácido ascórbico

ABA ácido abscísico

APX ascorbato peroxidasa

AS ácido salicílico

BPC bifenilos policlorados

CAT catalasa

CFC compuestos clorofluorocarbonados

Chl a clorofila a

Chl b clorofila b

DHAR dehidroascorbato reductasa

DTT dithiothreitol

EDTA ácido etilen dinitrilo tetracético

ERO especies reactivas de oxígeno

GPX glutatión peroxidasa

H₂O₂ peróxido de hidrógeno

HAP hidrocarburos aromáticos policíclicos

MDHAR monodehidroascorbato reductasa

MS medio de cultivo Murashinge y Skoog

O₂⁻ superóxido anión

·OH radical hidróxilo

POX peroxidasa

SOD superóxido dismutasa

TCA ácido tricloroacético

x + c xantofilas y carotenoides

1. INTRODUCCIÓN

La producción de flores y plantas ornamentales ha adquirido gran importancia económica. La demanda de flores día a día adquiere mayor importancia debido a que éstas alcanzan altos precios en el mercado nacional e internacional, además de que su producción se puede dar a gran escala. El Estado de México es el principal productor nacional, siendo los principales municipios Villa Guerrero, Tenancingo y Coatepec Harinas, en los cuales se producen diferentes variedades de flores, de las cuales seis generan 85% del valor de la producción (rosa, crisantemo, liliium, clavel, gerbera y gladiola; SIAP-SAGARPA. 2012).

Una de las grandes riquezas con las que cuenta el Estado de México es su condición agroclimática, lo que le ha permitido tener un importante crecimiento en el cultivo de flores, convirtiéndolo en el principal productor del país donde se trabajan 15 mil/ha, que involucran a 12 mil productores y generan alrededor de 200 mil empleos permanentes. La entidad aporta cerca del 80% de la flor que exporta el país, abasteciendo en un 4.1% al mercado estadounidense. Del total de la producción mexiquense, el 60% se destina al mercado interno y 40% al externo (Soto y Armando, 2006).

En México como en muchos otros países y sobre todo en el Estado de México la gran demanda de hortalizas y ornamentales que tienen una alta rentabilidad y por ende los suelos dedicados a estos cultivos, son los que están más contaminados o han sido la vía para alterar los elementos del ecosistema. Es reconocido que el uso excesivo de agroquímicos ocasiona entre otros problemas, la degradación y destrucción de los suelos, originando alteraciones ecológicas que producen daños a la salud humana, animal y vegetal, así como el deterioro del ambiente (Cerón, 2005).

Apuntes de la FAO (2008) estiman que cerca del 15% del área de tierra total del mundo está afectada por la erosión del suelo, la degradación física y química y la salinización, que implica más de 800 millones de hectáreas en el mundo. El valor

umbral relativo de los efectos negativos provocados por la salinidad puede variar dependiendo de varios factores como el tipo de planta, régimen de riego y la textura y calidad del suelo (Kutuk *et al.*, 2004). El problema de la salinidad en los suelos agrícolas se conoce desde tiempos remotos, en la actualidad incluye más de 100 países y se ve agravada cada día más por el uso de aguas de riego con alto contenido salino (Munns y Tester, 2008).

El principal origen de la salinidad en el suelo está relacionado con la acumulación de sales durante largos periodos en zonas áridas y semiáridas, sin embargo, otras causas naturales como la erosión de la roca que libera sales, principalmente cloruros de sodio, calcio y magnesio y en menor medida sulfatos y carbonatos, también contribuyen a elevar la salinidad en el suelo (Odeh y Onus, 2008). A parte de estos procesos naturales, la salinidad también puede ser provocada por la excesiva fertilización y la utilización de agua de riego de mala calidad, las sales introducidas por el agua de riego se acumulan en las raíces especialmente cuando la lixiviación es escasa (Rengasamy, 2006). El efecto de las sales sobre la fisiología de las plantas ocasiona un efecto osmótico y otro iónico; la acumulación de estas en la zona radicular provoca el descenso del potencial hídrico del suelo y dificulta la absorción de agua y nutrientes. El estrés salino puede también inducir estrés osmótico, así como la toxicidad por sodio (Shahba *et al.*, 2010). Una respuesta común al estrés salino es un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO Mittler, 2002). Estas ERO son altamente destructivas a las plantas ya que dañan proteínas, ácidos nucleicos, entre otros (Scandalios, 2005; Foyer y Noctor, 2005).

Muchos programas de manejo integrado de los cultivos contemplan la inducción de tolerancia a la salinidad (Shakirova y Bezrukova, 1997) Algunos estudios, actualmente han demostrado que la inducción de tolerancia a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico esta asociados a las respuestas oxidativas y antioxidativas de las plantas; por ello es importante el conocimiento de la participación de señales de estrés, para incrementar la tolerancia y/o resistencia de las plantas ante cualquier tipo de estrés. Existe evidencia de que moléculas como el ácido

salicílico (AS) participan en la señalización, que da lugar a las respuestas de adaptación a ambientes extremos y a la expresión de los sistemas de control del daño oxidativo por causa de estrés. De ahí, que el objetivo principal de este trabajo de investigación fue, la evaluación del efecto del ácido salicílico en la tolerancia a estrés salino en microplantas de crisantemo variedad Polaris white.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades del crisantemo.

El crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) es una planta originaria del oriente asiático de alto valor ornamental, gracias a sus flores de gran número de formas y colores (Kofranek, 1980). El crisantemo utilizado por los floricultores es un híbrido complejo, el cual si se cultiva de semilla, segrega flores de formas muy diversas. La mayoría de las especies de donde se han generado los cultivares actuales son originarias de China. Dentro de la fuente de germoplasma para los híbridos se incluyen *Chrysanthemum indicum* (un sencillo amarillo), *C. morifolium* (de colores rosa a lila) y la margarita Chusan (especie desconocida) la cual se piensa que es uno de los parientes del crisantemo pompón (Kofranek, 1980).

Categoría taxonómica	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Dendranthema</i>
Especie	<i>Dendranthema grandiflora</i>
Variedad	Polaris white

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del crisantemo (IAPT, 2011)

2.2. Descripción del crisantemo.

El crisantemo (*Chrysanthemum*), es un género de alrededor de 30 especies, perennes de la familia *Asteraceae*, es una inflorescencia compuesta que tiene flores en un receptáculo o cabezuela. Las inflorescencias sencillas (como margaritas) tienen flores radiales (hilera exterior) que son pistiladas y flores concéntricas (las centrales) que son bisexuales y fértiles. El receptáculo es plano o convexo y está rodeado de una envoltura de brácteas. En cada inflorescencia existen dos tipos: las flores del disco, que se encuentran en el centro, son

tubulares y perfectas (con parte masculina y femenina fértiles, con pétalos poco desarrollados), y las flores radiales o liguladas, que son imperfectas, y las flores fértiles se localizan en los márgenes, tienen pétalos largos y bien desarrollados (Arbos, 1992).

2.3. Problemas en el cultivo del crisantemo.

El cultivo de crisantemo, al igual que la mayoría de cultivos de importancia alimenticia y/o económica, es susceptible a un gran número de plagas y enfermedades que ocasiona pérdidas económicas; el índice de estos patógenos depende en gran medida de las condiciones climáticas, variedades cultivadas, manejo del cultivo y sobre todo la sanidad inicial del material vegetativo; el conocimiento de las causas, mecanismos de acción y síntomas es de importancia para aplicar métodos o técnicas adecuadas para su control (Mendoza, 2002). A nivel mundial, se reportan trece enfermedades causadas por hongos, cuatro por bacterias, seis por virus y una por un agente tipo fitoplasma (Horts y Nelson 1997).

Además, existen factores ambientales adversos que afectan el rendimiento de los cultivos tales como: temperaturas extremas, disponibilidad de agua, intensidad de luz, contaminación, radiación ultravioleta, disponibilidad de nutrientes y salinidad (Foyer *et al.*, 1994, 1997; Scott *et al.*, 1999; Bray *et al.*, 2000; Mora-Herrera *et al.*, 2005; Scandalios, 2005).

El estrés salino puede afectar los procesos fisiológicos tales como la germinación de semilla, crecimiento y desarrollo, que resulta en generar una reducción del crecimiento y la productividad de la planta (Ashraf, 2004). La salinidad induce perturbaciones metabólicas y daño celular, creando un estrés oxidativo que causa daño a las moléculas como: lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Misra y Saxena, 2009). El estrés salino puede también inducir estrés osmótico, así como la toxicidad por sodio (Shahba *et al.*, 2010). Una respuesta común al estrés salino es

un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO; Mittler, 2002).

2.3.1. Factores abióticos.

El ambiente cambia continuamente afectando a todos los organismos vivos, los cuales deben adaptarse para poder sobrevivir. Un organismo aparentemente bien adaptado a su ambiente, modifica su fisiología o desarrolla una repuesta a los cambios ambientales o condiciones metabólicas en corto tiempo. Los organismos que pueden ajustarse (por repuestas del genoma) a los cambios en el ambiente son los que muestran mayor grado adaptativo (Scandalios, 2002, 2005).

Las plantas también se ven afectadas por condiciones ambientales adversas (estrés abiótico), que dependiendo del agente causal, pueden dividirse en físicos y químicos. Entre los factores de estrés físicos se encuentra: temperaturas extremas (calor, frío, congelación), radiación UV, déficit o exceso de agua, entre otros, mientras que los factores de estrés químico son; salinidad (en su componente osmótico), contaminación atmosférica por metales pesados, toxinas, salinidad (en su componente iónico o tóxico) y carencia de elementos minerales, entre otros (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Los factores químicos incluyen el estrés nutricional, o la presencia de contaminantes inorgánicos (SO₂, NO_x, O₃, o metales pesados) u orgánicos como los CFC (compuestos clorofluorocarbonados), BPC (bifenilos policlorados) o HAP (hidrocarburos aromáticos policíclicos). Frecuentemente, se presentan combinaciones de dos o más de estas condiciones (Cabrera, *et al.*, 2006).

2.3.2. Estrés por salinidad.

El principal factor limitante en la productividad en los cultivos es la falta de agua, lo que lleva a la sequía y salinidad en los suelos. El efecto de las sales sobre la fisiología de las plantas presenta una doble vertiente, un efecto osmótico y otro iónico (Munns, 2002). La acumulación de sales en la zona radicular provoca el

descenso del potencial hídrico del suelo y dificulta la absorción de agua y nutrientes; pero la planta, a través de diferentes mecanismos, consigue restablecer el balance osmótico. Es en este punto cuando la absorción de las sales y su incorporación a los tejidos llevan a la aparición del efecto iónico que provocará diferentes daños en la planta dependiendo, por una parte de la sensibilidad del genotipo a las sales y, por otra, de la especie iónica implicada (Munns, 2002).

El estrés salino puede también inducir estrés osmótico, así como la toxicidad por sodio y la acumulación de osmoreguladores como la prolina para proteger contra la deshidratación (Shahba *et al.*, 2010).

El incremento del estrés por salinidad genera ERO que inhiben el crecimiento de las plantas. La tolerancia a la salinidad se da por una alta eficiencia en el sistema antioxidante, donde las ERO son importantes señales para la inducción de este sistema (Lee *et al.*, 2001).

2.4. Estrés oxidativo.

Los factores bióticos y abióticos causan estrés oxidativo a través de la producción y acumulación de ERO tales como: superóxido anión (O_2^-) peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidróxilo (OH) y oxígeno en estado singulete (1O_2), estas son producidas directa o indirectamente por diversas reacciones celulares y muchos comportamientos intracelulares están implicados en su generación (Scandalios, 2005; Mittler, 2002).

Las ERO inhiben la función enzimática, dañan proteínas, ácidos nucleicos y lípidos de la célula. Cuando las plantas están expuestas a condiciones ambientales adversas, el daño oxidativo ocurre porque el balance entre la producción de ERO y su desintoxicación por sistema antioxidante es alterado (Foyer *et al.*, 1994; Hernández *et al.*, 1995; Scandalios, 2005; Foyer y Noctor, 2005). El incremento de la producción de derivados de oxígeno tóxico, es un indicador de estrés oxidativo,

aunque, estas moléculas también son producidas por procesos metabólicos normales de la célula (Foyer *et al.*, 1994; Scandalios, 2005).

Las principales fuentes de generación de ERO son: el cloroplasto, la mitocondria, la membrana plasmática, la pared celular, el peroxisoma, el retículo endoplásmico, y el espacio apoplástico (Apel y Hirt, 2004; Scandalios, 2005; Foyer y Noctor, 2005; Bhattacharjee, 2005).

2.4.1. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

El H₂O₂ es el más estable de las ERO y puede difundirse a través de las membranas por los canales de agua o por canales especializados llamados peroxiporinas (Neill *et al.*, 2002). El H₂O₂ forma radicales hidroxilo cuya vida media es muy corta, apenas de nanosegundos, y sólo puede reaccionar con otras ERO y biomoléculas próximas a donde se produjo, por lo que no se considera una señal de transducción (Mori y Schroeder, 2004).

2.4.2. Función del H₂O₂ en las plantas.

El H₂O₂ es continuamente generado de varias fuentes, durante el metabolismo normal de las plantas. Se encuentra en diferentes concentraciones en condiciones óptimas que van de 60 µM-7mM en *Arabidopsis* a 1-2 mM en maíz y arroz (Jiang y Zhang, 2001) y sus niveles aumentan durante o en respuesta a estrés abiótico y biótico (Neill *et al.*, 2002; Desikan *et al.*, 2004).

El H₂O₂ participa en funciones fisiológicas de las plantas, como entrecruzamiento de proteínas (Ros Barcelo, 1998) y es intermediario de respuestas como el cierre de estomas inducido por ABA (Pei *et al.*, 2000) y el gravitropismo de raíces regulado por auxinas (Joo *et al.*, 2001). También participa como señal en: la respuesta hipersensitiva y en la resistencia sistémica adquirida (Levine *et al.*, 1994); en la muerte celular programada; en la producción de proteínas

relacionadas con la patogénesis (León *et al.*, 1995), en la aclimatación y en la tolerancia cruzada (Levine *et al.*, 1994; Foyer *et al.*, 1997; Gong *et al.*, 2001; Neill *et al.*, 2002).

Existen evidencias de que el H₂O₂ funciona como una señal de alarma en plantas mediante respuestas adaptativas a varios tipos de estrés (Desikan *et al.*, 2001, 2004).

2.5. Mecanismo de defensa contra estrés.

Las ERO son altamente destructivas a las funciones y estructura celular, por ello, se requiere un sistema de defensa antioxidante que reduzca su daño (Foyer *et al.*, 1994; Scandalios, 2005).

La capacidad de las plantas para compensar el incremento de estrés oxidativo, se limita por diferentes factores endógenos, como: sus antecedentes genéticos y factores exógenos, tales como: temperatura, luz y nutrientes, entre otros, por lo tanto, una alta capacidad antioxidante confiere alta tolerancia a un amplio rango de diferentes tipos de estrés ambiental (Polle, 1997).

2.5.1. Antioxidantes enzimáticos.

2.5.1.1. Sistema antioxidante enzimático.

Las enzimas antioxidantes constituyen un grupo de proteínas antiestrés que intervienen en la eliminación de las ERO. Entre ellas se encuentran: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la peroxidasa (POX), la ascorbato peroxidasa (APX) y la glutatión reductasa (Asada, 1992, Scandalios, 1990).

2.5.1.2. Catalasa (CAT).

La CAT (EC 1.11.1.6), se localiza (no exclusivamente) en peroxisomas, donde hay alta producción de H_2O_2 . CAT es una enzima tetramérica con un grupo hemo común en todos los organismos aeróbicos. Por su amplia distribución, conservación en la evolución de los organismos y su rápida capacidad para degradar al H_2O_2 se cree que desempeña una función importante de regulación entre los organismo y su medio ambiente (Scandalios, 2005).

La CAT es la única enzima que degrada al H_2O_2 sin reducir a ningún otro compuesto, de ahí que la CAT provee a la célula de un eficiente mecanismo para remover el H_2O_2 , cuando este es producido en altas concentraciones (Foyer y Noctor, 2005; Scandalios, 2005).

Otra característica importante de la CAT es que es regulada de acuerdo al ciclo circadiano, el cual tiene correlación con la fotorrespiración, lo que hace aún más importante a esta enzima en el control del estrés oxidativo ocasionado por el exceso de energía (McClung, 1997).

A pesar, de la importante función de la CAT en el control del H_2O_2 dentro de la célula, poco se sabe de sus funciones durante las condiciones de estrés, debido a su localización en el peroxisoma y por su extremada sensibilidad a la luz, temperaturas extremas, ozono, SO_2 , y ataque por patógeno (Willekens *et al.*, 1994).

Se ha reportado que el estrés por salinidad podría provocar la degradación de la enzima de la CAT por proteasas endógenas (Hertwig *et al.*, 1992). También se ha observado que el aumento de la catalasa se relaciona con una mayor tolerancia al daño oxidativo por frío (Lafuente *et al.*, 2004).

2.5.1.3. Peroxidasa (POX).

La POX (EC 1.11.1.7) es una hemoproteína monomérica que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos (fenoles, aminas aromáticas, e hidroquinonas) utilizando peróxido de hidrógeno como cofactor. Se encuentra en los peroxisomas, en los cloroplastos, en las vacuolas y en la pared celular (Narváez, 2002). Además de estar relacionada en la protección de la célula contra daños oxidativos causados por el H₂O₂, también interviene en el pardeamiento enzimático (oxidación) y la abscisión de flores y hojas, senescencia, dominación apical, dormancia, desarrollo de frutos, germinación y desarrollo, respuesta de resistencia a patógeno y tolerancia a patógenos, la elongación de la raíz, en los procesos de lignificación de la pared celular y en la degradación oxidativa del ácido indol-3-acético (Mehlhorn *et al.*, 1996; Jansen *et al.*, 2004).

La POX, forma una gran familia de peroxidases que tienen poca especificidad de sustrato; éstas son conocidas por funcionar en diferentes reacciones peroxidativas en la célula, remueven al H₂O₂ (Asada, 1992; Shigeoka *et al.*, 2002). La reducción del H₂O₂ por estas peroxidases es a través de una serie de donadores de hidrógeno entre ellos los compuestos fenólicos, sin embargo, la función específica de esta isoenzima y su regulación diferencial permanecen aún desconocidas (Mehlhorn *et al.*, 1996).

Se ha reportado un incremento de actividad peroxidasa en diversas plantas sometidas a estrés abiótico como en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Tennessee 86) en respuesta a la aplicación de diferentes concentraciones de un fungicida (Carbendazim Plus, Ruiz *et al.*, 1999) y en respuesta al estrés generado por bajas temperaturas en la variedad Petit Havana SR 1 (Gechev *et al.*, 2003).

2.5.1.4. Ascorbato peroxidasa (APX).

La APX (EC 1.11.1.11) es capaz de eliminar bajas concentraciones de H_2O_2 debido a su elevada afinidad por éste. La APX es una hemoperoxidasa que utiliza al ascorbato como dador de electrones para llevar a cabo la reducción del H_2O_2 . A nivel celular se encuentra, fundamentalmente, en cloroplastos, citosol y peroxisomas (Shigeoka *et al.*, 2002) aunque también se ha localizado en algunas especies en el apoplasto (Vanacker *et al.*, 1998).

Junto con las actividades de las enzimas CAT y APX, el ciclo ascorbato/glutación (también denominado ciclo de Halliwell-Asada) participa, asimismo, en la eliminación de H_2O_2 en células vegetales (Asada, 1984). Este ciclo consiste en una serie de reacciones redox acopladas en las que intervienen cuatro actividades enzimáticas: APX, monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutación reductasa (GR; EC 1.6.4.2) (Foyer y Halliwell, 1976; Asada 1984).

La actividad de APX generalmente se incrementa con la actividad de otros antioxidantes enzimáticos como la CAT, SOD y la GR en respuesta a varios factores de estrés. Se ha encontrado que el incremento de la actividad enzimática de las peroxidases y otras enzimas está asociado a la aclimatación a frío en plántulas de maíz (Prasad *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 1995), en algodón (Payton *et al.*, 2001) y en radículas de plántulas de pepino (Kang y Saltveit, 2002); y en papa la actividad enzimática de la APX es inducida por baja temperatura, durante el almacenamiento de los tubérculos (Kawakami *et al.*, 2002) y la dormancia de la papa (Rojas-Beltran *et al.*, 2000).

2.6. Mecanismo de defensa contra la salinidad.

2.6.1. Osmoprotectores.

El ajuste osmótico proporciona un medio de mantenimiento del contenido de agua en la célula, importante para la actividad celular, como consecuencia de la acumulación de solutos orgánicos en el citoplasma y en la vacuola en situaciones de estrés por salinidad en el suelo (Serraj y Sinclair, 2002). Los solutos compatibles (osmolitos, citosolutos) son metabolitos hidrofílicos, entre los que se destacan azúcares (sacarosa y fructosa), aminoácidos (prolina y betaína), glicerol, manitol y otros metabolitos de bajo peso molecular (Chen y Murata, 2002); estos mantiene el contenido celular de agua cuando se presenta una reducción en el potencial osmótico, como consecuencia de la acumulación de solutos orgánicos en el citoplasma y en la vacuola en situaciones de estrés por salinidad en el suelo (Serraj y Sinclair, 2002).

2.6.1.1. Prolina.

La prolina es un aminoácido que se encuentra en pequeñas cantidades en las plantas, cuando éstas crecen en condiciones óptimas; en condiciones de estrés, se ha encontrado que el contenido de prolina aumenta para actuar como un agente osmótico, protegiendo a la planta de la deshidratación y además se relaciona con la disminución del potencial hídrico en hojas y el contenido relativo de agua (Tajdoost *et al.*, 2007). La síntesis de la prolina se realiza a partir del ácido glutámico, tanto en condiciones normales como bajo estrés hídrico. Actualmente se reconocen dos vías metabólicas, glutamato y ornitina (Parra *et al.*, 1999; Avendaño *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2001). La prolina está relacionada con la expresión de genes de tolerancia de las plantas a diferentes condiciones de estrés, actuando como osmorregulador (Kavi Kishor *et al.*, 1995; Yoshiba *et al.*, 2007), estabilizador de proteínas y membranas, inductor de genes relacionados con estrés osmótico (Iyer y Caplan 1998). Se ha sugerido que la prolina es una fuente de carbono y nitrógeno fácilmente disponible en la rehidratación celular

(Brugière *et al.*, 1999). Muchas especies de plantas acumulan prolina libre en respuesta a la salinidad (Jiménez-Bremont *et al.*, 2006), deficiencia hídrica (Avendaño *et al.*, 2005) y frío (Konstantinova *et al.*, 2002).

Actualmente se realizan estudios para conocer las respuestas de tolerancia a estrés abiótico y biótico, donde se sabe que intervienen moléculas señal tales como: ácido ascórbico (AA), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ácido salicílico (AS), ácido abscísico (ABA) entre otros (Foyer *et al.*, 1997; Foyer y Noctor, 2005; Foyer y Lelandais, 1993; Levine *et al.*, 1994; Gong *et al.*, 2001; Neill *et al.*, 2002).

2.7. Ácido salicílico (AS).

El AS es un compuesto fenólico y constituyente natural de las plantas (Mady, 2009), de acuerdo con Raskin (1992), el AS debe incluirse en la categoría de fitohormonas, es una molécula de señalización importante ya que tienen efectos diversos sobre la tolerancia al estrés biótico y abiótico (López-Delgado *et al.*, 2007).

2.7.1. Importancia de ácido salicílico (AS) en las respuestas de estrés.

El estrés en las plantas generan una serie de respuestas de tolerancia o sensibilidad, en ellas la función de algunas moléculas como el AS participan en la inducción de tolerancia. Además, el AS participa en muchas funciones de las plantas tales como: retraso de la senescencia (Bourbouloux *et al.*, 1998), inductor de floración y tuberización así como de compuestos termogénicos y alelopáticos, entre otros (Raskin, 1992).

En los últimos años se han venido realizando actividades para mejorar la respuesta de algunos cultivos al estrés, como es en el caso de la utilización del AS. Los resultados indican que el AS incrementa la inducción de resistencia a la salinidad en plántulas de trigo (Shakirova y Bezrukova, 1997), tomate (Stevens *et al.*, 2006), y maíz (Gunes *et al.*, 2007) y al déficit de agua (Bezrukova *et al.*, 2001),

así como a la acción de daños por metales pesados en plantas de arroz (Mishra y Choudhuri, 1999).

El AS también puede ser utilizado como un regulador del crecimiento, ya que mejora el crecimiento y desarrollo de plantas. Muchos estudios han demostrado que la aplicación exógena de AS a plantas, bajo estrés salino, mejora los procesos de crecimiento y la planta regresa rápidamente a su condición normal (Hussein *et al.*, 2007; Yusuf *et al.*, 2007; Misra y Sazená, 2009; Szepesi *et al.*, 2009; Hayat *et al.*, 2010). Es inminente que este efecto es debido al aumento de la actividad de algunas enzimas antioxidantes como la CAT, la APX y la SOD (Eraslan *et al.*, 2007; Qureshi *et al.*, 2005).

Se ha sugerido que el AS podría actuar inhibiendo la actividad enzimática de la catalasa y de la ascorbato peroxidasa, que son las principales enzimas implicadas en la eliminación del H₂O₂ en plantas. Esta inhibición podría generar un aumento local de los niveles de H₂O₂ ("microburst") que permitiría intensificar y dispersar las señales requeridas para el establecimiento de las respuestas adaptativas de las plantas (Rao *et al.*, 1997). Además también hay otras respuestas implicadas, como la activación de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), lo que conduciría a la síntesis de compuestos fenólicos (Wen *et al.*, 2005); o a cambios en el patrón de isoenzimas de algunas proteínas (Lajara *et al.*, 2003; Minibayeba *et al.*, 2003) que afectarían a la acumulación de metabolitos secundarios al activar los procesos biosintéticos o inhibir el catabolismo de este tipo de compuestos.

Los factores bióticos o abióticos llevan a un estado de estrés oxidativo al cultivo, las respuestas involucradas en el estrés oxidativo pueden inducir tolerancia o aclimatación a estos factores. El conocimiento de la señalización en la inducción de tolerancia en las respuestas de estrés, así como de las moléculas involucradas, pueden ser utilizado en el manejo integrado del cultivo para inducir tolerancia de manera natural y disminuir el uso de agroquímicos en la producción de los cultivos de interés económico y alimenticio (Mora-Herrera, 2006).

Por lo que en el presente trabajo se evaluó el efecto del ácido salicílico en la tolerancia a estrés salino en microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white.

3. JUSTIFICACIÓN

La producción de flores y plantas ornamentales ha adquirido gran importancia económica. La demanda de flores día a día adquiere mayor demanda debido a que éstas alcanzan altos precios en el mercado nacional e internacional, además de que su producción se puede dar a gran escala. La zona sur del Estado de México en los que se destaca los municipios de Tenancingo, Villa Guerrero y Coatepec Harinas por ser estos de alto rendimiento en la producción agrícola sobre todo en la floricultura, para alcanzar localidad deseada es necesario un alto consumo y uso excesivo de agroquímicos, lo que ha provocado una alteración de los ecosistemas y a su vez un aumento de la salinidad en el suelo generando a la plantas un estrés osmótico que conlleva a una disminución en el rendimiento de los cultivos. Existen posibilidades a nivel de laboratorio con el empleo de agentes estresantes que permiten simular condiciones de estrés hídrico (osmótico), entre los que se recomiendan se encuentran: manitol, sorbitol, cloruro de sodio (NaCl) para generar dicho estrés.

Actualmente estudios han demostrado que cierto tipo de moléculas señal como AS participan adaptación y /o resistencia a ambientes extremos.

En el presente trabajo de investigación tuvo como finalidad evaluar el efecto del AS en la tolerancia a estrés salino en microplantas de crisantemo variedad Polaris white.

4. OBJETIVOS

4.1. General:

- Evaluar el efecto del ácido salicílico en la tolerancia a estrés salino con NaCl sobre microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white.

4.2. Específicos:

- Establecer el modelo biológico de tolerancia a estrés osmótico de microplantas de crisantemo variedad Polaris white.
- Estudiar el efecto *in vitro* del estrés osmótico con cloruro de sodio en microplantas de crisantemo.
- Estudiar el efecto del ácido salicílico en la inducción de tolerancia a estrés osmótico.
- Evaluar la actividad enzimática de CAT, APX, POX en respuesta al estrés osmótico en microplantas de crisantemo.
- Cuantificar el contenido de H₂O₂, prolina y pigmentos fotosintéticos en respuesta al estrés osmótico en microplantas de crisantemo.

5. HIPÓTESIS

El ácido salicílico es un inductor de resistencia a diferentes factores de estrés en las plantas, por lo que, empleado en condiciones *in vitro* inducirá tolerancia a estres salino con NaCl en microplantas de crisantemo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Sitio experimental.

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal, del Centro Universitario UAEM Tenancingo, Estado de México.

6.2. Material Biológico.

Se utilizaron plantas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white, libres de virus (TAV y TSWV) en condiciones *in vitro* obtenidas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Metepec, Estado de México, México.

6.2.1. Mantenimiento de microplantas.

De las microplantas obtenidas en cultivo *in vitro* libres de virus TAV y TSWV se propagaron, se tomaron esquejes con una yema axilar. Estos esquejes fueron cultivados y subcultivados entre 28 ± 2 días en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), para mantener una fuente permanente de material biológico.

Los cultivos se mantuvieron en un cuarto de incubación con un fotoperiodo de 16 horas, temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, y una radiación de ca $35 \mu\text{mol m}^2 \text{seg}^{-1}$, 400 - 700 nm.

6.3. Medio de Cultivo.

El medio básico utilizado fue el de Murashige y Skoog (MS, 1962. Anexo 1), el cual se preparó con sales inorgánicas, adicionando cantidades por litro: 100 mL de sales, 10 mL de sulfato de magnesio (MgSO_4), 10 mL de inositol, 5 mL de hierro, 1 mL de tiamina, 2 mL de pantotenato de calcio, 0.5 mL de glicina, 30 g de azúcar,

se aforó con H₂O destilada y se ajustó el pH a 5.6-5.7, con hidróxido de potasio (KOH) o ácido clorhídrico (HCl), después se agregaron 6 g de Agar o 2.35 de fitagel, se disuvió en calor (Anexo 1) Se colocaron en frascos de vidrio tipo gerber de 65 X 45 mm, con su debida tapa cada uno, se agregó en cada frasco 20 mL del medio.

En el caso de los medios con NaCl o AS (Anexo 2 y 3) se agregó antes de medir el pH. El material de laboratorio que se utilizó en la micropropagación (cajas petri, pinzas, bisturí, etc.) y el medio de cultivo se esterilizaron a 120°C durante 15 min en una autoclave en una presión de 15 lb cm² / min (Anexo 4).

6.3.1. Concentraciones de NaCl.

Las concentraciones de NaCl para inducir el estrés osmótico fueron de 0 (testigo), 50, 100, 150 y 200 mM (Anexo 2).

6.3.2. Solución concentrada de Ácido Salicílico (AS).

Para todas las concentraciones de AS 0,10⁻⁶, 10⁻⁵ y 10⁻⁴M (Anexo 3) se hizo una solución madre de 40 mg de AS en 100 mL de agua destilada. El AS se disolvió en 0.5mL de KOH 1N y posteriormente se aforó con agua destilada a 100 mL. Después se agregó la concentración requerida al medio y se ajustó el pH.

6.4. Evaluación de supervivencia.

La supervivencia (número de plantas vivas después del estrés) se evaluó a los 28±2 días después del tratamiento estrés osmótico con NaCl en diferentes concentraciones 0 (testigo), 50, 100, 150 y 200 mM; en el que se midieron los siguientes parámetros como número de hojas, longitud de raíz (cm), longitud de tallo (cm), peso fresco (mg, gr); de acuerdo con los resultados obtenidos de mínima sobrevivencia se eligió el modelo de microplantas de 28±2 días de edad expuestas a 100 mM ¹/₁₀ 150 mM de NaCl.

6.5. Descripción de los experimentos.

6.5.1. Modelo de respuesta de microplantas de crisantemo a estrés osmótico.

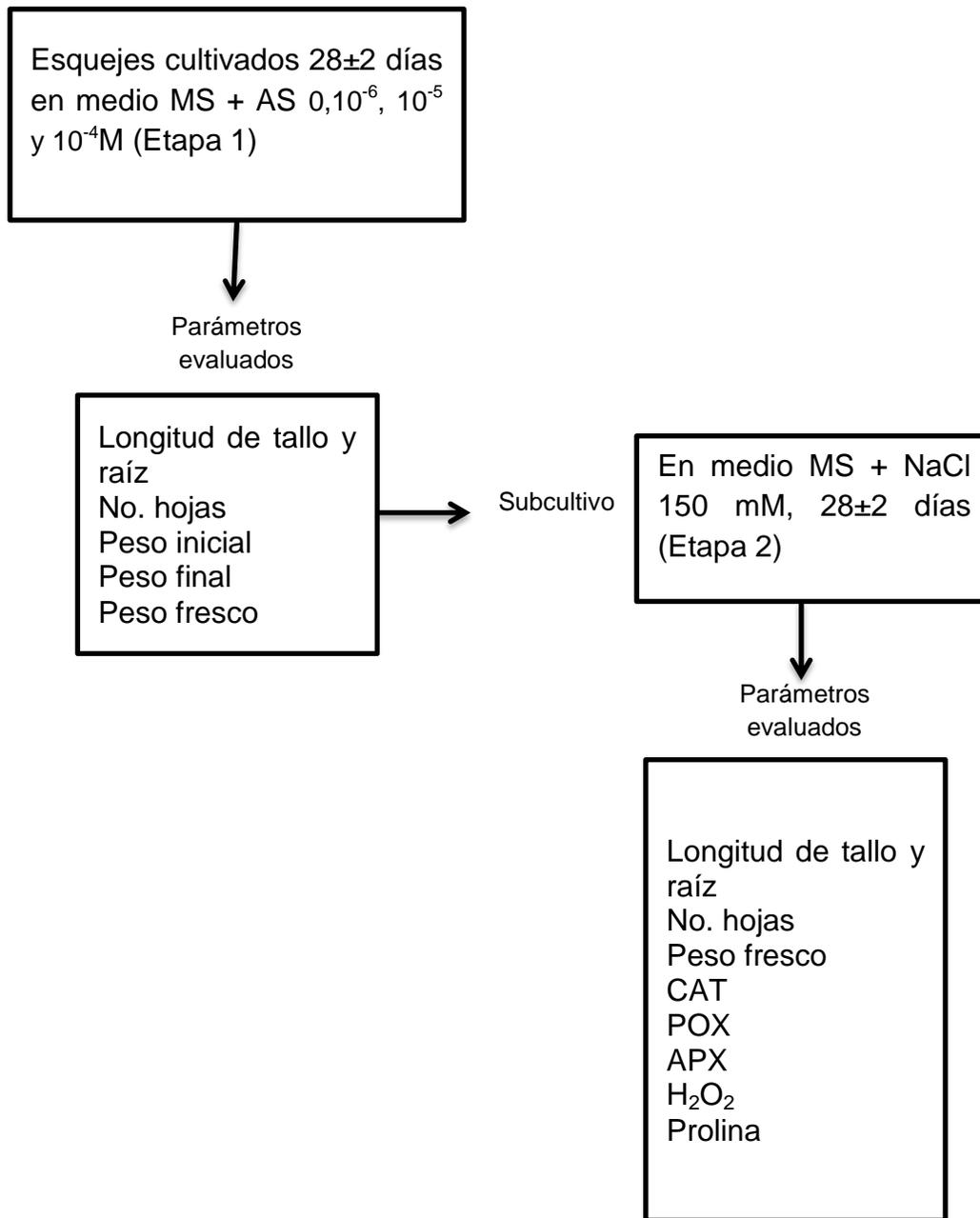
6.5.1.1. Efecto del NaCl en microplantas de crisantemo. (Modelo biológico).

Microplantas de crisantemo variedad Polaris white incubadas 28 ± 2 días en condiciones *in vitro*, se obtuvieron esquejes y se colocaron en medio MS con cloruro de sodio (NaCl) en concentraciones de 0 (testigo), 50, 100, 150 y 200 mM, durante 28 ± 2 días. Con los parámetros medidos (número de hojas, longitud de raíz (cm), longitud de tallo (cm), peso fresco (mg, gr)).

6.5.2. Efecto del AS en microplantas expuestas a estrés osmótico.

6.5.2.1. Microplántulas tratadas con AS.

En microplantas preincubadas con AS 0, 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} M durante 28 ± 2 días (Etapa 1), se evaluó longitud de tallo y raíz, peso inicial y final. Posteriormente fueron trasplantadas a medio de cultivo MS con 100 y 150 mM de NaCl; sin raíz en forma individual en tubos de 2 X 15 cm durante 28 ± 2 días (Etapa 2), se evaluó longitud de tallo y raíz, número y peso fresco, la actividad enzimática de CAT, POX, APX, y el contenido de H_2O_2 y prolina (Esquema 1);

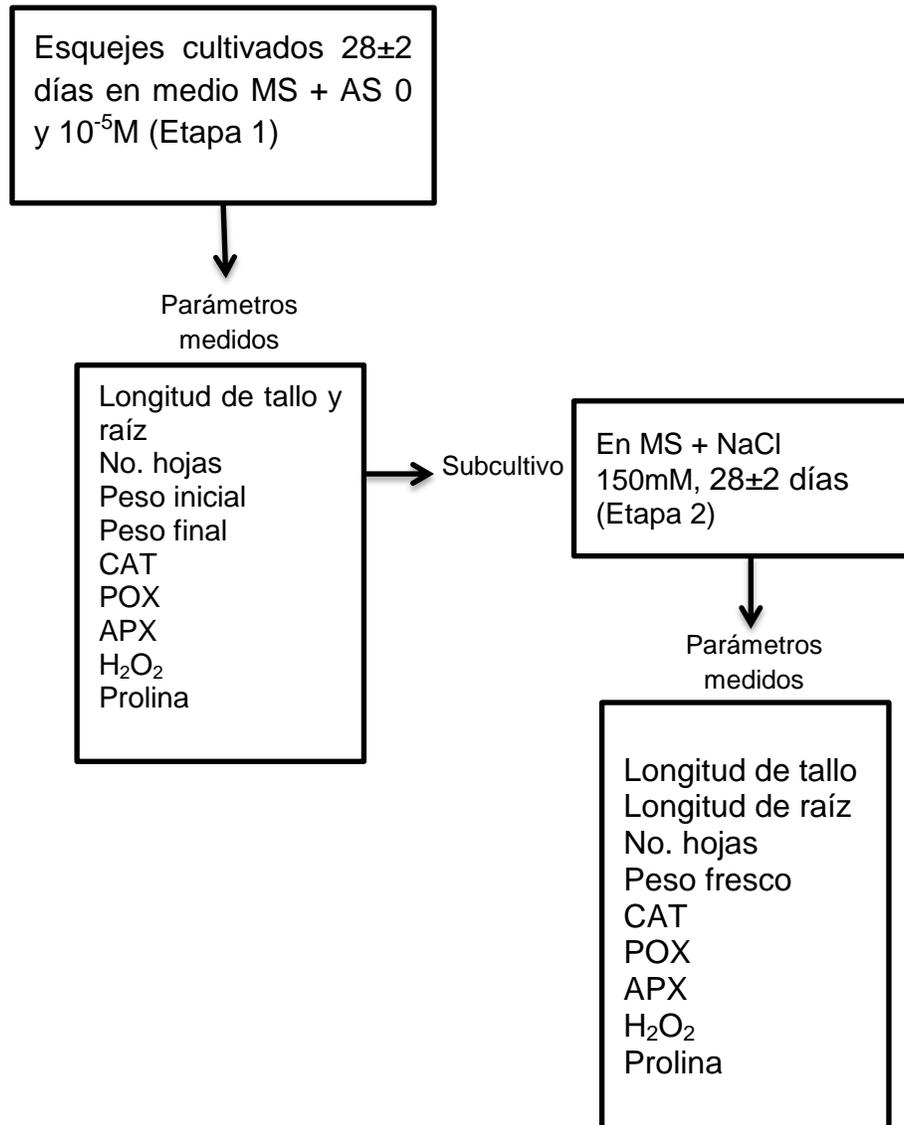


Esquema 1. Diagrama de flujo de la metodología empleada para condiciones *in vitro*.

6.5.3. Efecto de AS en las respuestas oxidativas y antioxidativas de microplantas expuestas a estrés osmótico.

En microplantas preincubadas con AS en las concentraciones de 0 y 10^{-5} M durante 28 ± 2 días (Etapa 1), se midió longitud de tallo y raíz, número de hojas, peso inicial y final, y la actividad enzimática antioxidante de CAT, POX, y APX, y el contenido de H_2O_2 , prolina y pigmentos fotosintéticos.

Las microplantas se trasplantaron por 28 ± 2 días a MS con 150 mM de NaCl sin raíz (Etapa 2), fue evaluada la longitud de tallo y raíz, número de hojas, peso fresco y la actividad enzimática antioxidante de CAT, POX y APX y el contenido de H_2O_2 , prolina y pigmentos fotosintéticos, (Esquema 2).



Esquema 2. Diagrama de flujo de la metodología empleada en la Etapa 1 y Etapa 2, para condiciones *in vitro*.

6.6. Técnicas empleadas.

Todas las cuantificaciones enzimáticas se midieron en tres muestras de cada tratamiento y por triplicado cada una en cada repetición experimental.

6.6.1. Cuantificación de la actividad enzimática de CAT.

La determinación de actividad enzimática de catalasa por espectrofotómetro se realizó de acuerdo a Aebi (1984).

Extracción de la proteína total

El tejido de la microplanta (sin raíces) se maceró con nitrógeno líquido y la proteína total se extrajo en una proporción de 1:3 (300 mg / 900 μ L) con el amortiguador de fosfato de potasio (50 mM pH 7.2) conteniendo 5 mM de dithiothreitol (DTT), 1 mM de ácido etilendinitrilotetracético (EDTA) y 2% de polyvinylpirrolidona (PVP; Anderson *et al.*, 1995). La mezcla homogénea se centrifugó a 11 000 x g durante 10 minutos a 4°C. La fracción sobrenadante se usó para medir la actividad enzimática de la catalasa y de la POX en espectrofotómetro.

Mezcla de reacción

La actividad enzimática de la catalasa se midió en la mezcla de reacción con amortiguador de fosfato de potasio y sodio 50 mM pH 7.0, 10 μ L del extracto de proteína (aproximadamente 100 μ g de proteína) y se adicionó como sustrato 30 mM de H₂O₂ en un volumen final de 3 mL. El blanco contenía amortiguador de fosfato de potasio y sodio 50 mM pH 7.0, 10 μ L del extracto de la muestra en un volumen final de 3 mL.

La reacción se inició con la adición de H₂O₂ 30 mM (solución preparada en amortiguador de reacción) a 25-28°C. Se midió el consumo de H₂O₂ como el decremento de la absorbancia a 240 nm en intervalos de 20 segundos durante 3 minutos, para obtener la actividad de la catalasa se usó el coeficiente de extinción para el H₂O₂ $\epsilon = 0.0394 \text{ mmol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$.

6.6.2. Cuantificación de la actividad enzimática de POX.

La cuantificación de la actividad enzimática de la peroxidasa (EC 1.11.1.7) por espectrofotometría se realizó de acuerdo con el método descrito por Srivastava y Dwivedi, (1998). La extracción de proteína se realizó de la manera descrita para catalasa (Anderson *et al.*, 1995).

Mezcla de reacción

La actividad enzimática de la peroxidasa se midió en la mezcla de reacción con amortiguador de fosfato de sodio 50 mM pH 7.0, 3.33 mM de guaiacol, 4 mM de H₂O₂ y 0.020 mL de la muestra en un volumen final de 3 mL. La reacción se inició con la adición de la muestra a 25-28°C. El blanco consistió en el amortiguador de reacción sin extracto de proteína. La oxidación del sustrato (guaiacol) se midió por el incremento en la absorbancia a 470 nm durante 3 minutos en intervalos de 30 segundos. Para determinar la actividad de la peroxidasa se usó el coeficiente de extinción del guaiacol $\epsilon = 2.6 \text{ mmol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$.

6.6.3. Cuantificación de la actividad enzimática de APX.

La cuantificación de la actividad de la ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11) por espectrofotometría se realizó de acuerdo al método descrito por Nakano y Asada (1981), con algunas modificaciones de Jiménez *et al.* (1997).

Extracción de proteína total

El tejido de la microplanta (sin raíces) se maceró con nitrógeno líquido y la proteína total se extrajo en una proporción de 1 g: 4 mL con el amortiguador de fosfato de sodio 100 mM pH 7.0, 1 mM de DTT, 5 mM de ácido ascórbico (Mittler y Ziliskans, 1993). La proteína soluble se aisló por centrifugación a 11 000 g por 10 minutos a 4°C. La fracción sobrenadante se usó para medir la actividad de la APX.

Mezcla de reacción

La actividad enzimática de la APX se midió en la mezcla de reacción con amortiguador de fosfatos de potasio 50 mM pH 7.0, 0.1 mM de ascorbato, 0.1 mM de EDTA, 0.040 mL del extracto de proteína y 2.7 mM de H₂O₂ en un volumen final de 2 mL.

El blanco consistió en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7.0 en un volumen final de 2 mL. La reacción se inició con la adición de H₂O₂, se registró el decremento en la absorbancia a 290 nm por la oxidación del ascorbato a intervalos de 30 segundos durante 3 minutos a 25-28°C. Para obtener la actividad de la APX se usó el coeficiente de extinción para el ascorbato $\epsilon = 0.28 \text{ mmol}^{-1}\text{mm}^{-1}$.

6.6.4. Cuantificación del contenido de proteína.

La cuantificación del contenido de proteína total se realizó con NanoDrop® ND-1000; es un espectrofotómetro de espectro total (220-750 nm) que mide concentraciones con 1 µl de muestra, con gran exactitud y reproductibilidad.

La muestra se diluyó en una proporción de 1:5 con buffer de potasio a 50 mM a un pH de 7.0, para el caso de CAT y POX. Para APX se diluyó a la misma relación con buffer de sodio al 100 mM pH7.0. La lectura se realizó colocando 2 µL de la muestra a una absorbancia de 280 nm. Los resultados obtenidos se expresan en mg/mL.

6.6.5. Cuantificación del contenido de H_2O_2 .

El contenido de H_2O_2 se cuantificó usando el método descrito por Alexiava *et al.*, (2001); en el cual el H_2O_2 reacciona con el yoduro en un medio ácido, liberando yodo que dará un color amarillo.

Extracción

El tejido de la microplanta (200 mg) se maceró en 1.2 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 1%. El sobrenadante se aisló por centrifugación a 12 000 rpm por 15 minutos a 4°C.

Mezcla de reacción

Para la mezcla de reacción uso 0.5 mL del sobrenadante, se añade 0.5 mL de buffer de fosfato de potasio 100 mM pH 7.0 y 1 mL de yoduro de potasio 1 M. la mezcla se agita cuidadosamente y se incuba en obscuridad durante 60 minutos.

El blanco consistió en TCA al 1% a un volumen final de 2 mL., se lee a una absorbancia de 390 nm.

Curva patrón del contenido H_2O_2

Para encontrar los rangos de concentración de H_2O_2 en tejidos de crisantemo variedad Polaris white se hizo una curva en la que se prepara una solución madre de H_2O_2 , con las concentraciones conocidas 0-100 μ M, se colocan 10 μ L de H_2O_2 (30%) en 990 μ L de TCA 1% de esta muestra se tomaron 100 μ L y se agregaron 990 μ L de TCA 1% para tener una concentración final de 300 μ g en 1000 μ L.

6.6.6. Cuantificación del contenido de Prolina.

El contenido de prolina se cuantificó de acuerdo al método de ninhidrina acida descrito por Bates *et al.*, (1973).

Curva patrón del contenido de prolina

Para encontrar los rangos de concentración de prolina en tejidos de crisantemo variedad Polaris White se hizo una curva la preparación de la solución madre de prolina fue con 23 mg disuelta en 10mL de ácido sulfosalicílico al 3%, equivalente a $20 \mu\text{moles mL}^{-1}$ ($0.00002 \text{ moles mL}^{-1}$). De esta solución se tomó 1 mL y se llevó a 50 mL con ácido sulfosalicílico al 3%, esta dilución equivale a $400 \text{ nmoles mL}^{-1}$ ($0.0000004 \text{ moles mL}^{-1}$).

Cuantificación de prolina en el tejido

El tejido de la microplanta (50 mg) se maceró en mortero con 1mL de ácido sulfosalicílico al 3%; se centrifugó a 4500 rpm durante 8 min. A 1 mL del sobrenadante se le adicionó 1mL de ninhidrina ácida y 1mL de ácido acético glacial. Para el blanco se tomo 1mL de ácido sulfosalicílico, 1mL de ninhidrina ácida y 1mL de ácido acético glacial.

Cada tubo se agitó en un vortex hasta obtener una emulsión. Después se colocaron en Baño María a punto de ebullición durante 60 minutos. Los tubos se taparon con papel aluminio y se sacaron los tubos, sumergiéndolos inmediatamente en agua con hielo hasta enfriar completamente las muestras (por 10 minutos).

Posteriormente a cada tubo se le adicionaron 2 mL de tolueno y se agitaron en un vortex. Se tomaron 1.5 mL de la parte superior de la muestra que se forma después de la agitación (rosa). Por ultimo se procedio a realizar la lectura de absorbencia a 520 nm en un espectrofotómetro

6.6.7. Cuantificación del contenido pigmentos fotosintéticos.

La cuantificación de pigmentos fotosintéticos se cuantificó de acuerdo al método descrito Lichtenthaler y Wellburn (1983).

Extracción

Para la extracción se maceraron 50 mg de tejido de hoja en 2 mL de acetona al 80% (4°C). El homogenado se centrifugo a 2500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó y se ajustó a 2 mL con acetona al 80%. Se midió la absorbancia a 470 nm, 646 nm y 663 nm. El blanco fue 2 mL de acetona al 80%.

Las concentraciones de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), xantofilas y carotenoides (*x + c*) se calcularon empleando las fórmulas:

$$\text{Chl } a = 12.21 A_{663} - 2.81 A_{646}$$

$$\text{Chl } b = 20.13 A_{646} - 5.03 A_{663}$$

$$C_{x+c} = (1000 A_{470} - 3.27 [\text{Chl } a] - [\text{Chl } b]) / 229$$

Los resultados obtenidos se expresaron en mg g⁻¹ de peso fresco de PF.

Los pigmentos fotosintéticos, se midieron en muestras de 12 plantas por tratamiento.

6.7. Análisis de resultados.

El diseño experimental utilizado fue en bloques al azar con 28 plantas por tratamiento. Los datos fueron analizados por medio de la prueba *t* Student ($P \leq 0.05$), para el caso del modelo biológico de estrés osmótico con NaCl.

Las diferencias entre las variables evaluadas como: las actividades enzimática, contenido de H₂O₂, prolina y pigmentos fotosintéticos, fueron analizadas por ANOVA Tukey, $P < 0.05$.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Modelo de respuesta a estrés osmótico de microplantas de crisantemo.

7.1.1. Efecto del NaCl en la supervivencia de microplantas de crisantemo.

La supervivencia se evaluó en microplantas incubadas con NaCl durante 28 ± 2 días, en donde el tratamiento de 200 mM de NaCl disminuyó la supervivencia hasta un 60%; mientras, que el tratamiento de 50 mM la disminuyó 36% con respecto al testigo (Fig. 1). De acuerdo con los resultados de supervivencia, se eligió el tratamiento de 100 mM de NaCl que presentó una disminución de la supervivencia del 32%; sin embargo, al ser trasplantadas a medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sin NaCl, se recuperaron al 100%, sin presentar signos ni síntomas como: disminución crecimiento, quemadura de hojas, etc. del previo estrés por NaCl. Entonces, como el objetivo era evaluar el efecto del NaCl, se determinó elegir el tratamiento con 150 mM de NaCl la cual disminuía hasta un 52% la supervivencia, y en el trasplante si se observaron síntomas y signos del efecto a la salinidad por NaCl.

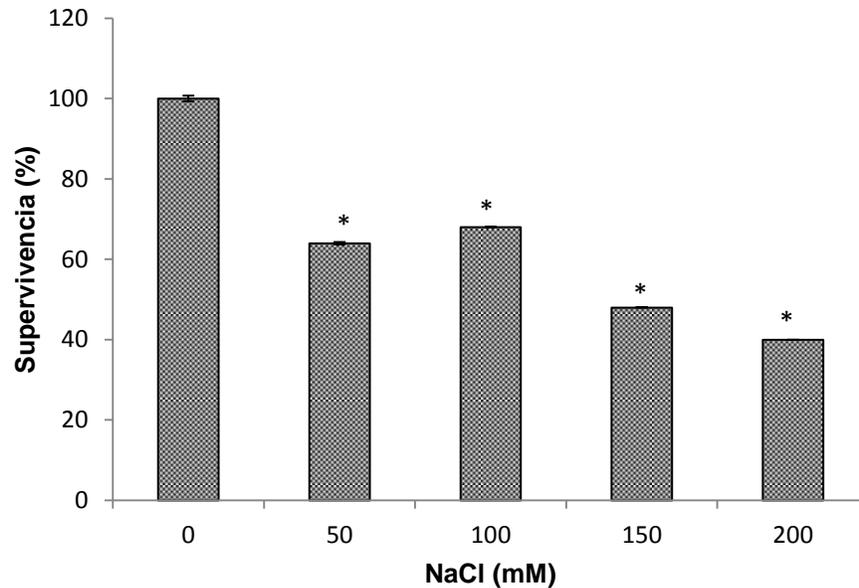


Figura 1. Supervivencia de microplantas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white, incubadas en NaCl 28±2 días. Los resultados son el promedio de 28 microplantas ± e.s. (*) diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$).

7.1.2. Efecto del NaCl sobre el crecimiento de microplantas de crisantemo.

Las microplantas incubadas en MS con NaCl durante 28±2 días, disminuyeron; longitud de tallo (Fig. 2) y raíz (Fig. 3), número de hojas (Fig. 4) y peso fresco (Fig. 5), siendo el tratamiento de 200 mM de NaCl, el que presento mayor decremento a estos parámetros con respecto al testigo. Cabe mencionar que este tratamiento inhibió completamente el desarrollo de la raíz (Fig. 3). Estos resultados concuerdan con los de Ghoulam *et al.* (2001), que mostraron que la salinidad por NaCl en altas concentraciones, causó reducción en las variables de crecimiento de área foliar, peso fresco y seco, de los brotes y las raíces de plantas de remolacha azucarera, afectando además las membranas de las células originando fluido celular (destrucción de membranas), es importante destacar que el NaCl fue

agregado al suelo junto con la fertilización, por lo que no se afectó la supervivencia ya que posiblemente al agregar de este modo el NaCl no es tan directo el daño, como en el caso de las microplantas de crisantemo que estuvieron expuestas por 28 días al NaCl directo en el medio de cultivo, por lo que se cree que el crisantemo es altamente tolerante bajo las condiciones establecidas a la salinidad (NaCl). Muhamman, *et al.*, (2012), reportan que el NaCl (20 y 40 Mm) agregado en el agua de riego durante 15 días durante la germinación de maíz (*Zea mays* L.), afecto la longitud de tallo y raíz, peso fresco y seco, y área foliar conforme se aumenta la concentración de NaCl; siendo el tratamiento de 40 mM la que afecto más las variables evaluadas. Esto reafirma que el crisantemo, variedad Polaris white es altamente tolerante a la salinidad ya que tolero hasta 150 mM de NaCl.

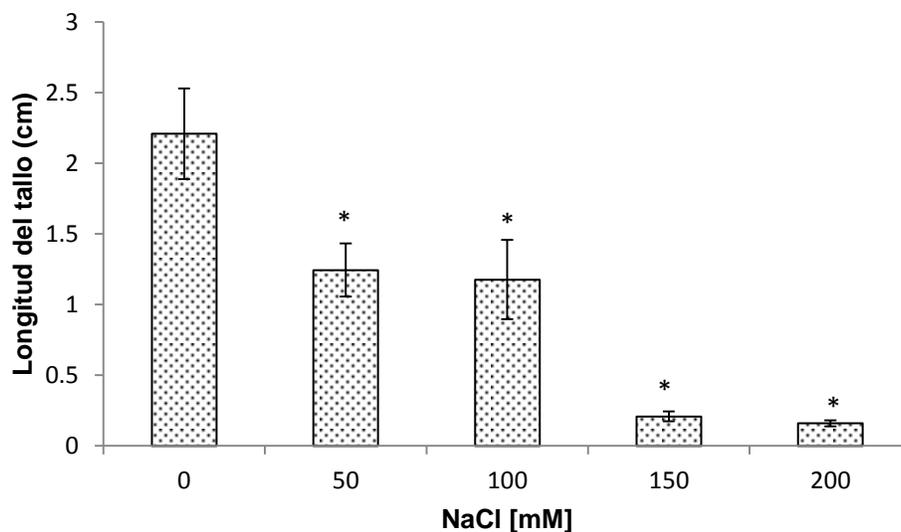


Figura 2. Longitud de tallo de microplantas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white, incubadas en NaCl, después de 28±2 días. Los resultados son el promedio de 28 microplantas ± e.s. (*) diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$).

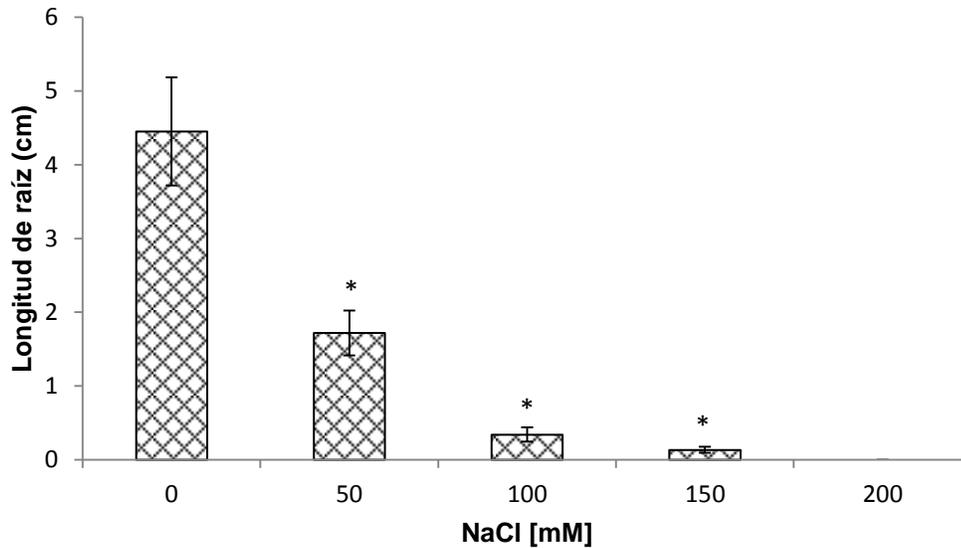


Figura 3. Longitud de raíz de microplantas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white, incubadas en NaCl, después de 28 ± 2 días. Los resultados son el promedio de 28 microplantas \pm e.s. (*) diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$).

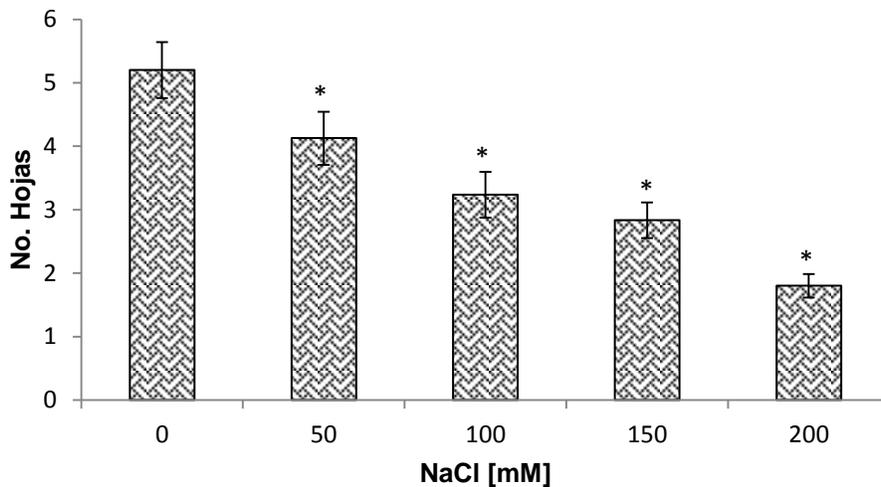


Figura 4. Número de hojas de microplantas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white, incubadas en NaCl, después de 28 ± 2 días. Los resultados son el promedio de 28 microplantas \pm e.s. (*) diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$).

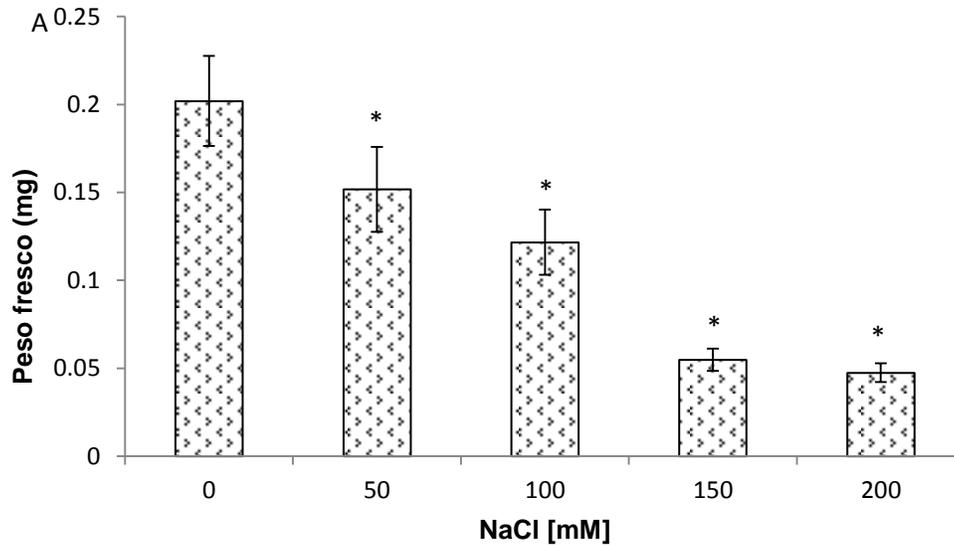


Figura 5. Peso fresco de microplantas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white, incubadas en NaCl, después de 28 ± 2 días. Los resultados son el promedio de 28 microplantas \pm e.s. (*) diferencia estadística (t Student, $P < 0.05$).

7.2. Efecto del ácido salicílico (AS) sobre microplantas expuestas a estrés osmótico.

7.2.1. Efecto de AS sobre microplantas de crisantemo.

Las microplantas preincubadas con AS durante 28 ± 2 días (Etapa 1), mostraron inhibición del crecimiento en tallo, raíz, y peso fresco (Fig. 6), siendo el tratamiento de 10^{-4} M de AS, el que presentó hasta un 51.3% en promedio de inhibición con respecto al testigo (Tabla 1). Con respecto al número de hojas no hubo diferencia significativa con respecto al testigo. Se ha observado que los salicilatos pueden causar severos daños a las plantas, porque disminuyen el proceso fotosintético, la conductividad estomática y la transpiración, lo que ocasiona estrés (Janda *et al.*, 2000); posiblemente esto es lo que originó la disminución del crecimiento del tallo y las raíces en las plantas de crisantemo expuestas a AS en condiciones *in vitro*. Los efectos inhibitorios del crecimiento por los salicilatos, también fueron observados en microplantas de papa (López-Delgado *et al.*, 1998; Mora-Herrera y López-Delgado 2006).

Es importante destacar, que el efecto en el crecimiento por los salicilatos indica posiblemente que la planta está bajo estrés, este estrés podría ser parte de una aclimatación que hace tolerante a las plantas cuando son sometidas a otro tipo de estrés (tolerancia inducida o cruzada; Gong *et al.*, 2001). Por lo que es posible que la inhibición en el crecimiento observada en las microplantas de crisantemo inducida por el AS (Fig. 6), fue indicativo de un estrés que puede generar aclimatación inducida, por esta razón generó tolerancia a la salinidad, además de que se observó engrosamiento de hojas y raíz, y mayor número de raíces (Fig. 7).

Para evaluar el efecto del AS en la tolerancia a la salinidad de microplantas de crisantemo; se tomó como referencia el tratamiento de 10^{-5} M, ya que disminuyó aproximadamente un 17.2% los parámetros de crecimiento (la longitud tallo 20%, longitud de raíz 15.81% y peso fresco 15.79%), aunque, se obtuvieron los mismos resultados estadísticos en los tratamientos con 10^{-6} M (~18.39% de crecimiento,

Tabla 1). Sin embargo, se decidió estudiar el efecto del AS a 10^{-5} M por ser una concentración ya reportada en inducir tolerancia a factores de estrés abiótico en microplantas de papa (López-Delgado *et al.*, 2004; Mora-Herrera *et al.*, 2005; 2006).



Figura 6. Longitud de tallo y raíz de microplantas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white, incubadas en diferentes concentraciones de AS.

Tabla 1. Longitud de raíz y tallo, número de hojas y peso fresco de microplantas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white, incubadas en AS.

Tratamientos de AS [M]	Raíz (cm)	Long. Tallo (cm)	No. Hojas	Peso Fresco (mg)
0	3.67 ± 0.5 a	2.51 ± 0.26 a	5.26471 ± 0.34 a	0.18767 ± 0.011 a
10 ⁻⁶	3.29 ± 0.47 a	2.04 ± 0.25 ab	4.61765 ± 0.36 a	0.15186 ± 0.008 a
10 ⁻⁵	3.09 ± 0.47 a	2.01 ± 0.25 b	4.87097 ± 0.41 a	0.15739 ± 0.016 a
10 ⁻⁴	1.01 ± 0.42 b	1.72 ± 0.17 b	4.9 ± 0.4 a	0.11028 ± 0.007 b

Los datos son el promedio de 36 plantas ± e. s. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P > 0.05$)

7.3. Efecto del pretratamiento de AS en microplantas de crisantemo expuestas a estrés osmótico con NaCl.

Las microplantas pretratadas con AS (10⁻⁵ M; Etapa 1), fueron trasplantadas sin raíz a MS conteniendo 150 mM de NaCl durante 28±2 días (Etapa 2). De manera general, las microplantas pretratadas con AS no presentaron diferencias significativas con respecto al testigo en el crecimiento, lo que indica (como ya se había mencionado en el apartado 7.1.2), la alta tolerancia de las plantas de crisantemo a la salinidad, por otro lado es importante mencionar que, si bien, en el modelo sugerido se obtuvo que la concentración de 150 mM de NaCl disminuía hasta un 52% la supervivencia; este efecto no se observó al trasplantar las microplantas completas a NaCl, posiblemente esta respuesta se deba, a que en la evaluación del modelo al NaCl (apartado 7.1, 7.1.1), la supervivencia fue evaluada con microplantas provenientes de esqueje, mientras que la evaluación del pretratamiento de AS más NaCl, fue en microplantas completas (Tabla 2). El efecto más notorio de la salinidad fue cuando se presentó, mayor desarrollo y número de raíces en las plantas preincubadas en AS, además de ser más

vigorosas (gruesas) que el control y las hojas fueron más gruesas y cerosas que el testigo (Fig. 7).

Tabla 2. Crecimiento de microplantas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white, preincubadas en AS, trasplantadas a 150 mM de NaCl.

Pretratamiento de AS [M]	Raíz (cm)	Long. Tallo (cm)	No. Hojas	Peso Fresco (mg)
0	5.88571 ± 0.52	8.05714 ± 0.66	11 ± 0.57	0.80321 ± 0.05
10 ⁻⁵	6.69231 ± 0.54	7.44231 ± 0.64	10.8846 ± 0.79	0.58788 ± 0.06

Los datos son el promedio de 36 plantas ± e. s.



Figura 7. Desarrollo de raíces y hojas de microplantas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white, preincubadas en AS y trasplantadas en NaCl (150 mM): A) 0, B) 10⁻⁴, C) 10⁻⁵ y D) 10⁻⁶ M de AS.

7.4. Efecto del AS en las respuestas oxidativas, antioxidativas, osmoprotectores y pigmentos fotosintéticos sobre microplantas de crisantemo expuestas a NaCl.

Se cuantificó la actividad enzimática catalasa (CAT), peroxidasa (POX) y ascorbato peroxidasa (APX) y el contenido de H₂O₂, prolina, y pigmentos fotosintéticos. Las cuantificaciones se realizaron en dos etapas:

1. A los 28±2 días de incubación *in vitro* en medio MS con AS 0 y 10⁻⁵ M (Etapa 1).
2. Después de trasplantadas sin raíz a MS 150 mM con NaCl durante 28±2 días (Etapa 2).

7.4.1. Efecto del pretratamiento de AS en la actividad enzimática de la CAT en microplantas de crisantemo expuestas a NaCl

En microplantas de 28±2 días de incubación en 10⁻⁵ M de AS (Etapa 1), la actividad enzimática de la CAT, tiende a incrementarse con respecto al testigo, aunque este incremento no fue significativo (Fig. 8).

Después del pretratamiento en AS, las microplantas fueron trasplantadas sin raíz a MS con NaCl 150 mM (Etapa 2), en la que no se observaron diferencias significativa en la actividad enzimática de la CAT entre el tratamiento y el testigo, aunque, si hubo una disminución significativa en la actividad enzimática de la CAT de la Etapa 1 a la Etapa 2, tanto en el tratamiento como en el testigo (Fig. 8), estos resultados pueden acoplarse a los que reportan Hertwig *et al.*, (1992) donde indican, que el estrés salino podría provocar la degradación de la enzima de la CAT por proteasas endógenas; esto pudo haber ocasionado la disminución de la actividad enzimática de la CAT cuando fueron trasplantadas a estrés salino con NaCl durante 28± 2 días.

La disminución de la actividad enzimática de la CAT, posiblemente se debe también, a que el ácido salicílico, se une de manera específica a las enzimas que

contienen hierro como las catalasas, aconitasas y peroxidasas (Ruffer *et al.*, 1995), dicha unión cambia la actividad de las enzimas modificando rápidamente la tolerancia de las plantas al estrés oxidativo (Willekens *et al.*, 1997). La disminución de la actividad enzimática de la CAT por AS también ha sido observada en microplantas de papa lo que está relacionado a la inducción de tolerancia a estrés abiótico (Mora-Herrera *et al.*, 2005).

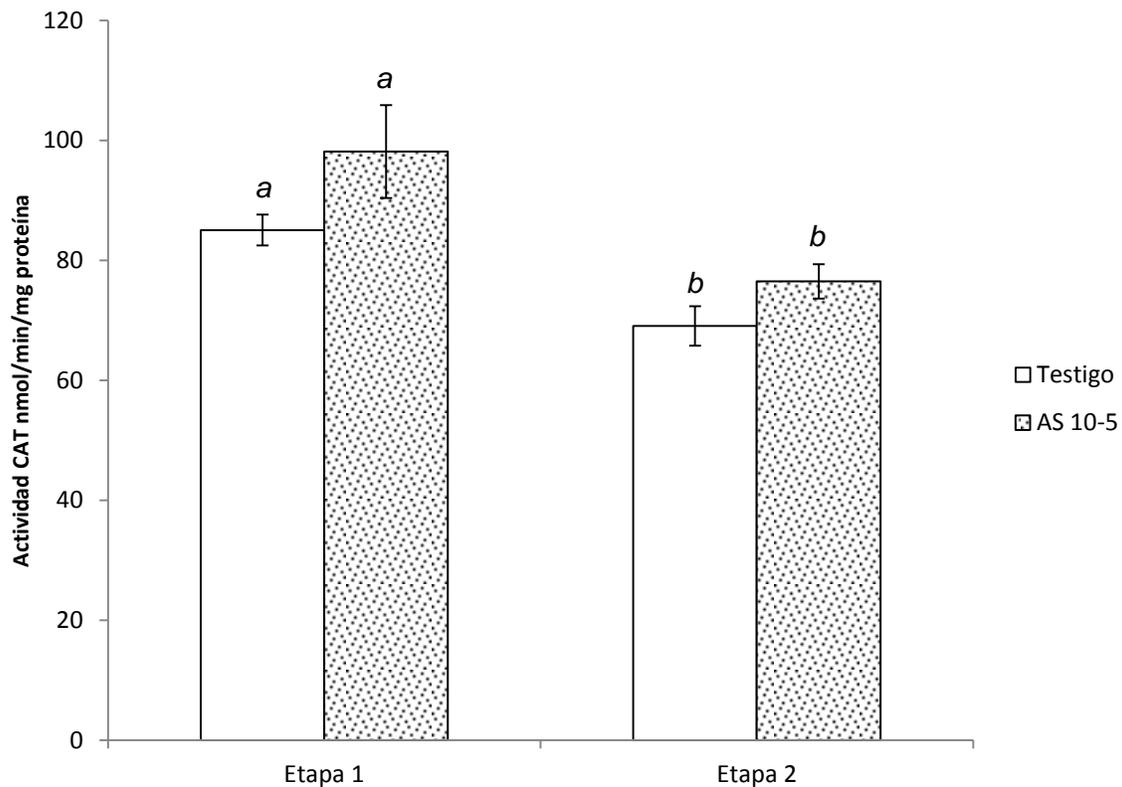


Figura 8. Actividad enzimática de la CAT de las microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white, cultivadas *in vitro* en MS con AS 0 y 10^{-5} M (Etapa 1), trasplantadas sin raíz a MS con NaCl 150 mM (Etapa 2). Los resultados son el promedio de 4 repeticiones, \pm e.s. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$).

7.4.2. Efecto del pretratamiento de AS en la actividad enzimática de la POX en microplantas de crisantemo expuestas a NaCl.

En las microplantas de 28 ± 2 días de incubación en 10^{-5} M de AS (Etapa 1) y en el trasplante de las microplantas sin raíz a MS con 150 mM de NaCl durante 28 ± 2 días (Etapa 2), la actividad enzimática de la POX, tiende a incrementarse con respecto al testigo aunque no fue significativo (Fig. 9).

En general las peroxidasas son enzimas que incrementan su actividad ante el estrés, principalmente para contrarrestar el daño originado por ERO (Scandalios, 2005); y aunque en esta investigación la actividad enzimática de la POX no aumento significativamente en ninguna de las dos etapas evaluadas, no quiere decir que las microplantas no estuvieran bajo un estrés originado por la salinidad, ya que se observaron efectos de achaparramiento, y engrosamiento de raíces y hojas presentados en las microplantas (Fig. 7).

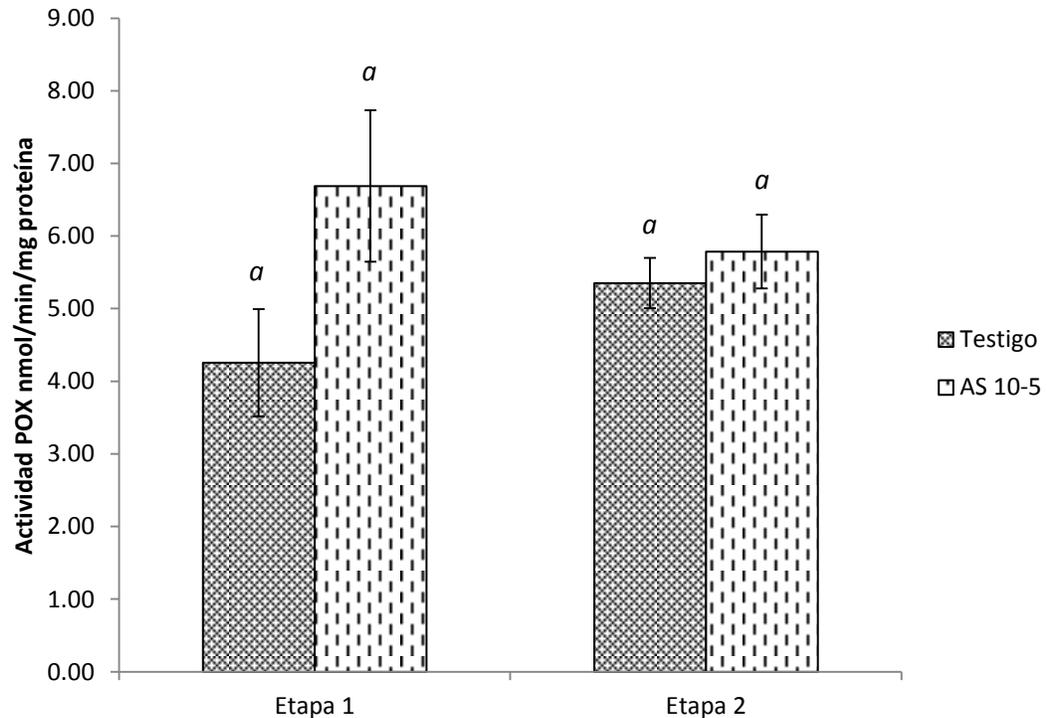


Figura 9. Actividad enzimática de la POX en microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white, cultivadas *in vitro* en MS con AS 0 y 10^{-5} M (Etapa 1), trasplantadas sin raíz a MS con NaCl 150 mM (Etapa 2). Los resultados son el promedio de 4 repeticiones, \pm e.s. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$).

7.4.3. Efecto del pretratamiento de AS en la actividad enzimática de la APX en microplantas de crisantemo expuestas a NaCl

En microplantas de 28 ± 2 días de incubación en 10^{-5} M de AS (Etapa 1), y al trasplantar las microplantas sin raíz a MS con 150 mM de NaCl durante 28 ± 2 días (Etapa 2) la actividad enzimática de la APX, presentó una disminución en el tratamiento con respecto al testigo aunque no fue significativa (Fig. 10). Sin embargo, la actividad enzimática de la APX aumento significativamente en el tratamiento y el testigo de la etapa 1 a la etapa 2 (Fig. 10).

La disminución de la actividad de APX en el presente estudio podría estar de acuerdo con los resultados de otras investigaciones que indican que AS puede impedir la actividad APX en hojas de tabaco y en *P. vulgaris* (Conrath *et al.*, 1995; Palma *et al.*, 2009). Según El-Khallal *et al.* (2009), la actividad de enzimas antioxidantes depende de la duración del tratamiento, la edad y la especie de la planta.

El incremento observado de la actividad enzimática de la APX, de la Etapa 1 a la Etapa 2, pudo darse quizás para proteger a las microplantas de crisantemo contra el estrés oxidativo generado por la salinidad con NaCl.

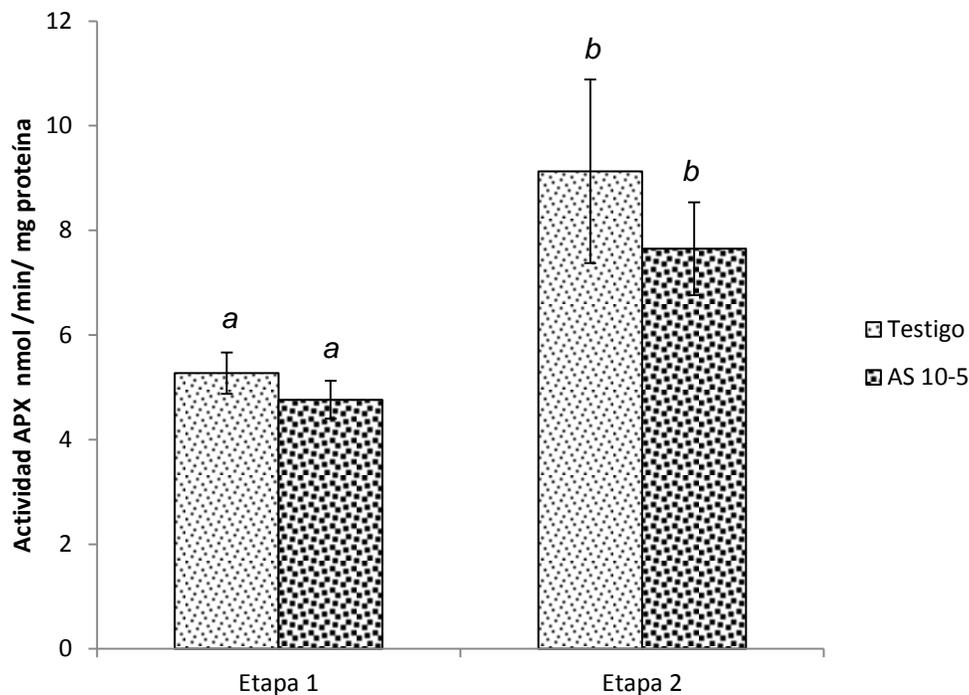


Figura 10. Actividad enzimática de la APX en microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white, cultivadas *in vitro* en MS con AS 0 y 10^{-5} M (Etapa 1), trasplantadas sin raíz a MS con NaCl 150 mM (Etapa 2). Los resultados son el promedio de 4 repeticiones, \pm e.s. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$).

7.4.4. Efecto del pretratamiento de AS en el contenido de H₂O₂ en microplantas de crisantemo expuestas a NaCl.

En microplantas de 28±2 días de incubación en 10⁻⁵ M de AS (Etapa 1), el contenido de H₂O₂ mostró un decremento aunque no fue significativo con respecto al testigo (Fig. 11). Sin embargo, después del pretratamiento con AS de las microplantas trasplantadas sin raíz a MS con NaCl 150 mM (Etapa 2), este decremento fue significativo.

Es importante destacar que el contenido de H₂O₂, aumento significativamente de la etapa 1 a la etapa 2, aumentando un 77% en el testigo y un 48% en el pretratamiento de AS, (Etapa 2, Fig. 11); estos resultados indicaron que el estrés salino por NaCl, generó mayor estrés oxidativo en las microplantas testigo que en las pretratadas con AS en la etapa 1. El AS contribuyó a inducir tolerancia a este estrés.

Se ha reportado que en microplantas de papa incubadas en presencia de AS, la actividad catalasa disminuyó, lo que confirma que el AS inhibió la actividad catalasa y eso condujo a la acumulación del contenido H₂O₂ lo que genero tolerancia al frio (López-Delgado *et al.*, 1998), sin embargo, por los resultados obtenidos en este trabajo no hay relación entre la actividad catalasa y el contenido de H₂O₂.

Los niveles de H₂O₂ aumentan ante un estrés, este incremento tiene una doble función durante las respuestas al estrés (Dat *et al.*, 2000; Apel y Hirt, 2004; Scandalios, 2005; Foyer y Noctor, 2005; Navrot *et al.*, 2007); incrementando el daño oxidativo que lleva a la destrucción de los componentes celulares o como señal para activar las respuestas de defensa (Dat *et al.*, 2000; Guan y Scandalios, 2000).

Velikova *et al.* (2000), informaron que después de estrés, se observa un aumento en el contenido de H₂O₂, e hizo hincapié en que el H₂O₂ puede difundirse a distancia causando cambios relativamente largos en el estado redox de las células y los tejidos circundantes, mientras que a concentraciones relativamente bajas, se inicia una respuesta antioxidante.

Es posible que el decremento de peróxido en la Etapa 2, se haya debido al pretratamiento del AS, además esta concentración pudo haber sido la óptima para generar respuestas de tolerancia al NaCl.

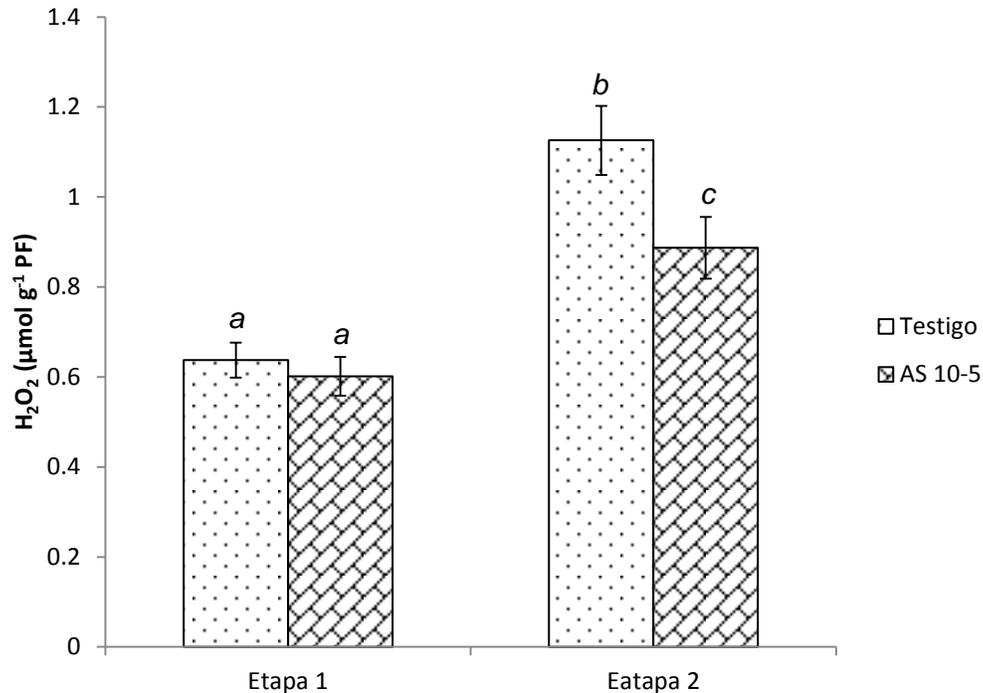


Figura 11. Contenido de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) en microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white, cultivadas *in vitro* en MS con AS 0 y 10⁻⁵ M (Etapa 1), trasplantadas sin raíz a MS con NaCl 150 mM (Etapa 2). Los resultados son el promedio de 4 repeticiones, ±e.s. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P < 0.05$).

7.4.5. Efecto del pretratamiento de AS en el contenido de prolina en microplantas de crisantemo expuestas a NaCl.

En las microplantas de 28 ± 2 días de incubación en 10^{-5} M de AS (Etapa 1) el contenido de prolina, mostró un incremento significativo de 12.8 veces con respecto al testigo (Fig. 11); esto posiblemente se debió a que la planta sufre un estrés durante la incubación en AS. Al trasplantar sin raíz a MS 150 mM de NaCl durante 28 ± 2 días (Etapa 2), el contenido de prolina disminuyó significativamente con respecto al testigo; esto pudo deberse a que la preincubación con AS, indujo tolerancia al estrés por salinidad con NaCl previa inducción de osmolitos en la Etapa 1 (Fig. 11). Estos resultados concuerdan con los descritos por Mercedes (2007), que encontró un aumento significativo en el contenido de prolina en hojas de *Capsicum annum*, cuando las plantas fueron sometidas a 50 mM de NaCl, alcanzándose los valores más altos a 200 mM. En ensayos llevados a cabo con *Quercus rugosa*, el contenido de prolina incrementó al aumentar las concentraciones de cloruro de sodio (Dracup, 1991; Zamacona, 2005). La acumulación de prolina se atribuye a que se incrementa su síntesis y disminuye su degradación (Kavi Kishor *et al.*, 2005). Sairam y Tyagi (2004), mencionan que en las plantas existe una fuerte correlación entre los niveles altos de prolina y la capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales de salinidad.

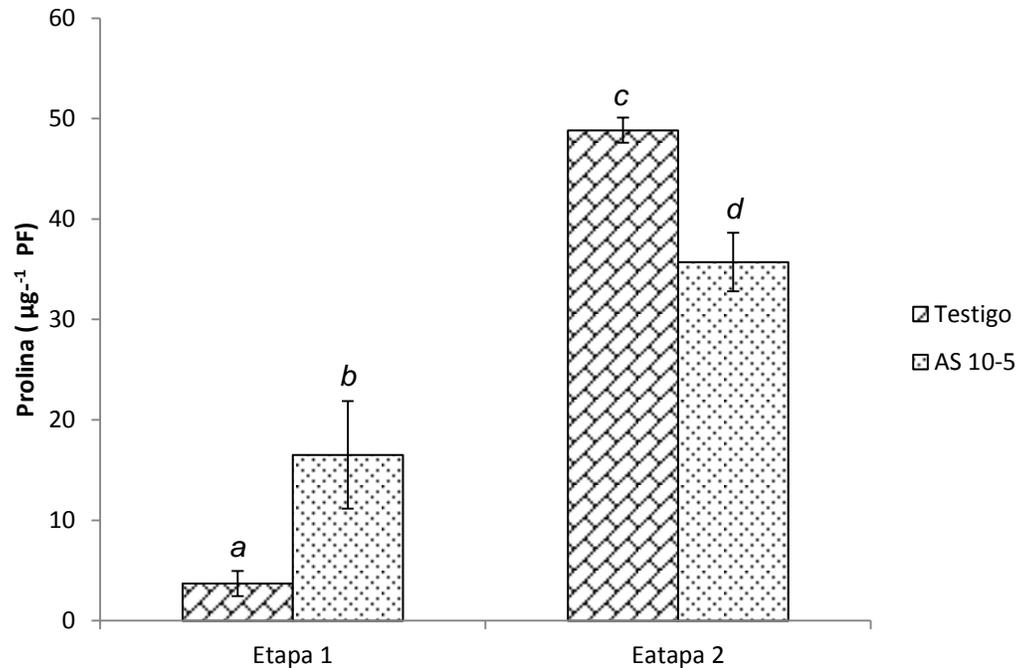


Figura 12. Contenido de prolina en hojas de microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white, cultivadas *in vitro* en MS con AS 0 y 10⁻⁵ M (Etapa 1), trasplantadas sin raíz a MS con NaCl 150 mM (Etapa 2). Los resultados son el promedio de 4 repeticiones, ±e.s. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, P < 0.05).

7.4.6. Efecto del pretratamiento de AS en el contenido de pigmentos fotosintéticos en microplantas de crisantemo expuestas a NaCl.

En las microplantas de crisantemo de 28 ± 2 días de incubación en 10^{-5} M de AS (Etapa 1), hubo una tendencia a incrementar la clorofila *a* y *b* con respecto al testigo, aunque no fue significativo (Fig. 13). Al trasplantar las microplantas sin raíz a MS 150 mM de NaCl durante 28 ± 2 días (Etapa 2), no se observó diferencia significativa en ningún pigmento, aunque, hubo disminución significativa en el contenido de clorofila *a*, *b* y *c* + *x*, entre la Etapa 1 a la Etapa 2 (Fig. 13).

En plantas de soya, tratadas con AS, aumento el contenido pigmentos, así como la tasa fotosintética (Zhao *et al.*, 1995), en este caso en las microplantas de crisantemo preincubadas en AS, no aumento significativamente el contenido de pigmentos fotosintéticos, o este no fue detectado correctamente por errores metodológicos.

Khodary (2004), encontró que en hojas de maíz los tratamientos de AS incrementaron los contenidos de clorofila *a*, *b* y carotenoides en condiciones de estrés salino, en esta investigación no existió diferencia estadística significativa, en estos parámetros, lo que no quiere decir que no hubiera diferencia, puede ser que no fueron correctamente detectadas por errores metodológicos, ya que la literatura reporta que si hay cambios importantes.

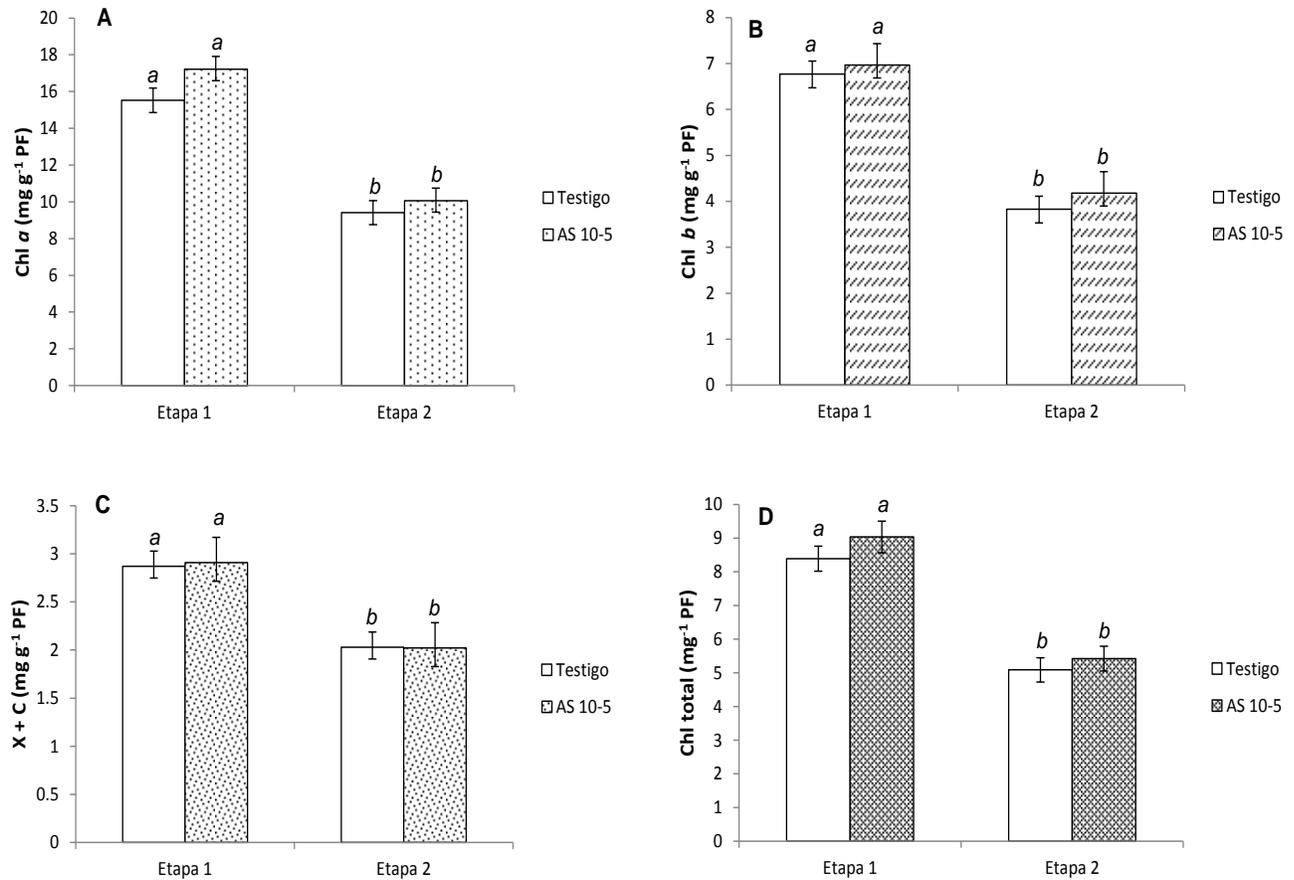


Figura 13. Contenido de pigmentos fotosintéticos: A) Clorofila a, B) Clorofila b, C) Carotenoides + Xantofilas y D) Clorofila total de microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) variedad Polaris white, cultivadas *in vitro* en MS con AS 0 y 10⁻⁵ M (Etapa 1), trasplantadas sin raíz a MS con NaCl 150 mM (Etapa 2). Los resultados son el promedio de 4 repeticiones, \pm e.s. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, P < 0.05).

Cabe mencionar que posiblemente cuando no se encontraron diferencias significativas, en algunas variables evaluadas en este trabajo, sea debido a que el número de repeticiones de cada prueba, fue el mínimo necesario, además de los posibles errores metodológicos en la estandarización de las técnicas empleadas. Mora-Herrera (2007), menciona que para eliminar el error estándar y metodológico

es necesario realizar las repeticiones de 4-13 veces con 12 plantas por tratamiento.

Gadea *et al.*, (1999), mencionan que las actividades enzimáticas (enzimas antioxidantes) de las plantas parecen estar bajo un control estricto que depende de la etapa del desarrollo y de los estímulos ambientales. Otra característica importante de las enzimas, en especial de la CAT es que es regulada de acuerdo al ciclo circadiano, el cual tiene correlación con la fotorrespiración, lo que hace aún más importante a esta enzima en el control del estrés oxidativo ocasionado por el exceso de energía (McClung, 1997). Esto reafirma que debe tenerse un control muy estricto en la toma de muestras, hasta en la misma hora del día, ya que puede afectar los resultados.

Un factor más es que las microplantas eran muy pequeñas y esto dificulta la toma de la muestra para que sea homogénea, el tamaño de la microplanta limitaba el número de hojas para la extracción de la enzima.

Parte de la información de este trabajo fue aceptada para su publicación en memorias en extenso en el XVII Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas. Agricultura Sustentable: uso eficiente del agua, suelo y fertilizantes. Con título “Efecto del ácido salicílico en la tolerancia a estrés salino con NaCl en microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white”. Mexicali Baja California, octubre 2014 (Anexo 6).

8. CONCLUSIONES

1. El cultivo *in vitro* es una alternativa efectiva para el estudio de las respuestas de las plantas en este caso crisantemo variedad Polaris white a condiciones de estrés.
2. El crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzelev) variedad Polaris white, es tolerante a altas concentraciones de salinidad por NaCl.
3. El AS incrementa la tolerancia a NaCl en microplantas de Crisantemo.
4. El pretratamiento de AS en microplantas de crisantemo incremento el número y grosor de raíces.
5. La acumulación de prolina, determino la capacidad de las plantas a sobrevivir en condiciones de salinidad.

9. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda seguir investigando los efectos que genera el estrés por salinidad con NaCl en las raíces, ya que estas son las que se encuentran más expuestas al estrés.
2. Aumentar el número de repeticiones por tratamiento para tener mejor control en los resultados obtenidos.
3. Evaluar la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) ya que esta actúa como la primera enzima de defensa contra la oxidación producida por las ERO.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzimology* 105:121-126.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, V. 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and weath. *Plant Cell and Environmental*. 24:1337-1344.
- Anderson, M. D.; Prasad, TK, and Stewart, C.R. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*. 109:1247-1257.
- Apel, K. and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55:373-99.
- Arbos, L. A. 1992. El crisantemo: cultivo, multiplicación y enfermedades. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 170 p.
- Asada, K. 1984. Chloroplast: Formation of active oxygen and its scavenging. *Methods Enzymol*. 105:422-429.
- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant*. 85:235-241.
- Ashraf, M. 2004. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora* 199:361–76.
- Avendaño, C. H.; Trejo, C.; López, C.; Molina, J. D.; Santacruz, A.; Castillo, F. 2005. Comparación de la tolerancia a la sequía de cuatro variedades de maíz (*Zea mays* L.) y su relación con la acumulación de prolina. *Interciencia* 30(9):560–564.

- Azcón-Bieto, J., Talón, M. 2008. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Capítulo 29: Fisiología de las plantas y el estrés (2nd ed.) Interamericana-McGraw-Hill, Madrid, pp. 577-597.
- Bates, L.; Waldren R.P. and Teare I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207
- Bezrukova, M.V.; R. Sakhabutdinova; R. A. Fatkhutdinova; I. Kyldiarova and F. Shakirova. 2001. The role of hormonal changes in protective action of salicylic acid on growth of wheat seedlings under water deficit. *Agrochemiya (Russ)*. 2:51–54.
- Bhattacharjee, S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Role in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science*. 89(7):1113-1121.
- Bourbouloux, A., P. Raymond, and S. Delrot. 1998. Effects of salicylic acid on sugar and amino acid uptake. *J. Exp. Bot.* 49:239-247.
- Bray E. A., Bailey-Serres, J. and Weretilnyk. 2000. Responses to abiotic stresses. In Buchanan B, Gruissem W and Jones R, ed. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA. American Society of plant physiologist Press. pp. 1158-1203.
- Brugière, N; Dubois, F; Limami, A.M.; Lelandais, M.; Roux, R. S.; Sangwan, B; Hirel. 1999. Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. *Plant Cell* 11:1995–2011.
- Cabrera-De la Fuente., M., A. Benavides-Mendoza, L.O. Fuentes-Lara, H. Ortega-Ortíz, H. Ramírez, J.L. Rosales-Velázquez. 2006. Acumulación de plata por semillas de sandía expuestas a diferentes concentraciones de nitrato de plata. Memoria del Simposio Internacional Alternativas para la Rehabilitación de Suelos Contaminados con Metales Pesados y Metaloides.

- Colegio de Posgraduados y Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. ISBN 970-92068-2-2.
- Cerón, R. 2005. Enzimas del suelo: Indicadores de salud y calidad. *Acta biológica*. 10:5-18.
- Chen, T. and N. Murata. 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Plant Biol*. 5, 250-257.
- Conrath, U., Chen, Z. X., Ricigliano, J.R., Klessig, D. F. 1995. Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisoinicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 92:7143-7147.
- Dat, J., Vandenamee, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé D. and Van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 57:779-795.
- Desikan, R., Cheung, M-K, Bright J, Henson D, Hancock JT and Neill SJ. 2004. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *Journal of Experimental Botany*. 55(395):205-212.
- Desikan, R., Mackerness-H S.A, Hancock J.T. and Neill S.J. 2001. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology*. 127:159-172.
- 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-Khallal, S.M., Hathout, T.A., El Raheim, A., Ahsour, A., Almalik, A., Kerit A. 2009. Brassinolide and Salicylic Acid Induced Antioxidant Enzymes, Hormonal Balance and Protein Profile of Maize Plants Grown under Salt Stress. *Res. J. Agric. Biol. Sci*. 5(4):391-402.

- Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A., Alpaslan, M. 2007. Impact of exogenous salicylic acid on the growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity. *Sci. Hortic.* 113:120-128.
- FAO. 2008. Global network on integrated soil management for suitable use of salt affected soils. *FAO Land and Plant Nutrition Management Services.*
- Foyer, C.H. and Lelandis M. 1993. The roles of ascorbate in the regulation of photosynthesis. In *Photosynthetic Responses to the Environment* (ed. H.Y. Yamamoto). America Society of Plant Physiologists. Rockville. Pp 88-101.
- Foyer, C.H., Descaurvieres P and Kunert KJ. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanisms studied in transgenic plants. *Plant Cell and Environmen.*17:507-523.
- Foyer, C.H., Halliwell B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase: aproposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21–25
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado H., Dat J.F. and Scott, I.M. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. *Physiologia Ptlantarum.* 100:241-254.
- Foyer, C.H., Noctor G. 2005. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in physiological context. *Plant Cell and Environmen.* 28:1056-1071.
- Gadea, J., Conejero, V., Vera, P. 1999 Developmental regulation of a cytosolic ascorbate peroxidase gene from tomato plants. *Mol Gen Genet* 262(2):212-9.
- Gechev, T.; Willekens, H.; Van Montagu, M.; Inze, D. 2003. Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *Journal of Plant Physiology* 160(5):509-515.

- Ghoulam, C., F. Ahmed and F. Khalid, 2001. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environ. Exp. Bot.*, 47:139–50.
- Gong, M., Chen, B., Li, Z-G and Guo L-H. 2001. Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H₂O₂. *Journal of Plant Physiology*. 158(9):1125-1130.
- Guan LM and Scandalios JG. 2000. Hydrogen-peroxide-mediated catalase gene expression in response to wounding. *Free radical Biology and Medicine*. 28(8):1182-1190.
- Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Bagci, E.G., Cicek, N. 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *J. PlantPhysiol*. 164:728-736.
- Hayat, Q., Hayat, S.H., Irfan, M., Ahmad, A. 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environ. Exp. Bot*. 68:14–25.
- Hernández, J.A., Olmos, E., Corpas, F.J., Sevilla, F. and del Rios, I.A. 1995. Salt-inducedoxidativer stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science*.105:151-167.
- Hertwig, B., P. Streb and J. Feierabend. 1992. Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and influence of interfering stress conditions. *Plant Physiol.*, 100:1547-1553.
- Horst, K.R. and Nelson, E.P. 1997. *Compendium of ChysanthemumDiseases*.The American Phytopathological Society. St. Paul. USA. 62 p
- Hussein, M.M., Balbaa, L.K., Gaballah, M.S. 2007. Salicylic Acid and Salinity Effects on Growth of Maize Plants. *Res. J. Agric. Biol. Sci*. 3(4):321-328.

- IAPT, (International Association for Plant Taxonomy). 2011. Catalogue of life: 2011. Annual Checklist. Indexing the world's Known Species. [En línea]. Disponible en <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2011v1/search.php> (Consultado el 12 de septiembre de 2013).
- Iyer, S. A. Caplan. 1998. Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes. *Plant Physiology* 116:203-211.
- Janda, T., G. Salía, Z. Antunovics, E. Horváth, E. Páldi. 2000 Effect of benzoic acid and aspirin on chilling tolerance and photosynthesis in young maize plants. *Maydica* 45:29-33.
- Jansen, M.; Elfstrand, M.; Heggie, L.; Sitbon, F.; Dix, P.; Thorneley, R. 2004. Over-expression of phenol-oxidising peroxidases alters the UV-susceptibility of transgenic *Nicotiana tabacum*. *New Phytologist* 163:585-594.
- Jiang, M. and Zhang, J. 2001. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidant defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiology*. 42(11):1265:1273.
- Jimenez, A., Hernández, J.A, del Río, L.A., Sevilla, F. 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol* 114:275–284.
- Jiménez-Bremont, J. F., A. Becerra-Flora, E. Hernández-Lucero, M. Rodríguez-Kessler, J. A. Acosta-Gallegos and J. G. Ramírez Pimentel. 2006. Proline accumulation in two bean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine. *Biologia Plantarum* 50:763-766.
- Joo, J.H., Bae, Y.S. and Lee, J.S. 2001. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiology*. 126:1055-1060.
- Kang, H-M and Saltveit, M.E. 2002. Reduced chilling tolerance in elongating cucumber seedling radicles is related to their reduced antioxidant enzyme

- and DPPH-radical scavenging activity. *Physiologia Plantarum*. 115:244-250.
- Kavi Kishor, 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.
- Kawakami, S., Matsumoto, Y., Matsunaga, A., Mayama, S. and Mizuno, M. 2002. Molecular cloning of ascorbate peroxidase in potato tubers and its response during storage at low temperature. *Plant Science*. 163(4):829-836.
- Khodary, S.E.A., 2004. Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis, and carbohydrate metabolism in salt-stressed maize plants. *J. Agric. Biol.* 6, pp. 5-8.
- Kofranek, M. A. 1980. Cut Chrysanthemums. In: *Introduction to Floriculture*. R. A.
- Konstantinova, T., D. Parvanova, A. Atanassov, D. Djilianov. 2002. Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant Science*. 163:157-164.
- Kutuk, C., Cayci, G., Heng, L.K. 2004. Effects of increasing salinity and N15 labelled urea levels on growth, N uptake, and water use efficiency of young tomato plants. *Australian Journal of Soil Research* 42:345-351.
- Lafuente, M.T., Sala, J.M., Zacarias, L. 2004 Active oxygen detoxifying enzymes and phenylalanine ammonia-lyase in the ethylene-induced chilling tolerance in citrus fruits. *J. Agric. Food Chem.* 52:3606-3611.
- Lajara, M.M., Calderón, A.A., Ferrer, M.A. 2003. Effect of salicylic acid on peroxidase activity from *Vitis* spp. *in vitro* cultures. En: *Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology*. Acosta M, Rodríguez-López N, Pedreño MA,

- ed. Universidad de Murcia. Servicio de Publicaciones. 84-8371-379-9. pp. 260-266.
- Lee, D.H., Kim, Y.S. and Lee, C.B. 2001. The inductive responses of antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology*. 158:737-745.
- León, J., Lawton, M.A. and Raskin, I. 1995. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*. 108(4):1673-1678.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. 79:583-593.
- Lichtenthaler, H.K.; Wellburn, A. R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11:591-592.
- López-Delgado, H. A., Scott, I.M., and Mora-Herrera M.E. 2007. Stress and antistress effects of salicylic acid and acetyl salicylic acid on potato culture technology. In Hayat S. and Ahmad A. ed. *Salicylic acid a plant hormone*. Netherlands Springer Press pp. 163-195.
- López-Delgado, H., J. F. Dat, C. H. Foyer, I. M. Scott. 1998. Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. *J. Exp. Bot.* 49 (321):713-720.
- López-Delgado, H., Mora-Herrera, M.E., Zavaleta-Mancera, H.A., Cadena-Hinojosa, M. and Scott, I. M. 2004. Salicylic acid enhanced heat-tolerance and potato virus X (PVX) elimination during thermotherapy of potato microplants. *American Journal of Potato Research*. 81:161-166.
- Mady, M. A. 2009. Effect of foliar application with salicylic acid and vitamin E on growth and productivity of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant. J. Agric. Sci. Mansoura Univ.* 34, pp.6735-6746.

- McClung, C.R. 1997. Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radical Biology and Medicine*. 23(3):489-496.
- Mehlhorn, H., Leladais, M., Korth, H.G. and Foyer, C.H. 1996. Ascorbate as the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Letters*. 378:203-206.
- Mendoza, Z. C. 2002. Fungicidas en ornamentales Pp. 119-120. En: Bautista M.N, J. Alvarado, J.C. Chavarín, H. Sánchez. (eds). Manejo Fitosanitario de Ornamentales. Instituto de Fitosanidad y Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 237 p.
- Mercedes Elizabeth Chaman Medina. 2007. Variaciones en el contenido relativo de agua y la concentración de prolina en *Capsicum annum* L. inducido por NaCl. *Arnaldoa* 14(2):251- 258.
- Minibayeva, F., Mika, A., Lüthje, S. 2003. Salicylic acid changed the properties of extracellular peroxidase activity secreted from wounded wheat (*Triticum avensis* L.) roots. *Protoplasma* 221:67–72
- Mishra, A. and M.A. Choudhuri. 1999. Effect of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in rice. *Biol. Plant*. 42:409–415.
- Misra, N., Saxena, P. 2009. Effect of salicylic acid on proline metabolism in lentil grown under salinity stress. *Plant Sci*. 177:181-189.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trend Plant Sci*. 7:405–410.
- Mora-Herrera M.E y López Delgado, H. 2006. Tolerancia a baja temperatura inducida por ácido salicílico y peróxido de hidrógeno en microplantas de papa. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 29(2):81-85.

- Mora-Herrera M.E. 2007. Estrés oxidativo, respuesta antioxidante y tolerancia a baja temperatura en microplatas de *Solanum tuberosum* L. Tesis Doctorado. Posgrado en ciencias biológicas, Facultad de ciencias. pp. 142.
- Mora-Herrera, M.E., Lopez-Delgado, H., Castillo-Morales, A. and Foyer, C.H. 2005. Salicylic acid and H₂O₂ function by independent pathways in the induction of freezing tolerance in potato. *Physiologia Plantarum*. 125:430-440.
- Mori, I.C. and Schroeder, J.I. 2004. Reactive Oxygen Species activation of plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiology*. 135:702-708.
- Muhammad Usman, Ahtisham U.I Haq, Taswar Ahsan, Sonia Amjad, Zainab Riasat and Muhammad Umar, 2012. Effect of NaCl on Morphological Attributes of Maize (*Zea mays* L.). *Botany Research International* 5 (3):57-60.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25:239-250.
- Munns, R., Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59:651-681.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Nakano Y, Asada K (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*. 22, 867-880.
- Narváez, C.E. 2002. Estudio de la maduración y evaluación de los daños por frío del fruto de uva caimaroná (*Pouruma cecropiifolia*). Químico. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá.

- Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E and Jacquot J-P. 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*. 129:185-195.
- Neill, S.J., Desikan, R. and Hancock, J. 2002. Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 5(5):388-395.
- Odeh, I.O.A., Onus, A. 2008. Spatial analysis of soil salinity and soil structural stability in a semiarid region of New South Wales, Australia. *Environmental Management* 42:265-278.
- Palma, F., Liuch, C., Iribance, C., Jose, M., Garrido, G., Noel, A., Tejera, G. 2009. Combination effect of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in phaseolus vulgaris. *Plant Growth Regul.* 58:307-316.
- Parra, R.; Rodríguez, J. L.; González, V. A. 1999. Transpiración, potencial hídrico y prolina en zarzamora bajo déficit hídrico. *Terra Latinoamericana*. 17:125–130.
- Payton, P.; Webb, R.; Kornyejev, D.; Allen, R.; and Holaday, AS. 2001. Protecting cotton photosynthesis during moderate chilling at high light intensity by increasing chloroplastic antioxidant enzyme activity. *Journal of Experimental Botany*. 52 (365):2345-2354.
- Pei, Z-M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E. and Schroeder J.I. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*. 406:731-734.
- Polle, A. 1997. Defense against photooxidative damage in plants. In: oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Pp 623-666.

- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A. and Stewart, C.R. 1994. Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiology*. 105:619-627.
- Qureshi, M.A., Israr, M., Abdin, M.Z., Iqbal, M. 2005. Responses of *Artemisia annua* L. to lead and salt-induced oxidative stress. *J. Environ. Exp. Bot.* 53:185-193.
- Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., Murr, D.P., Watkins, C.B. 1997. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes.
- Raskin, I., 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology*. 43, pp. 439-463.
- Rengasamy, P. 2006. World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany* 57:1017-1023.
- Rojas-Beltran, J.A., Dejaeghere, F., Abd Alla Kotb, M. and Du Jardin, P. 2000. Expression and activity of antioxidant enzymes during potato tuber dormancy. *Potato Research*. 43:383-393.
- Ros Barcelo, A. 1998. Hydrogen peroxide is a general property of the lignifying xylem from vascular plants. *Annals of Botany Company*. 82:97-103.
- Ruffer, M., Steipe, B., Zenk, M.H. 1995 Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase. *FEBS Lett.* 377:175-180.
- Ruiz, J.; García, P.; Rivero, R.; Romero, L. 1999. Response of phenolic metabolism to the application of carbendazim plus boron in tobacco. *Physiol. Plant.* 106:151-157.
- Sairam, R. K. and A. Tyagi. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*. 86. No.3:407-421.

- Sanchez, E; López–Lefebvre, L. R.; Carlos, G. P; rivero, R. M; Ruiz, J. M.; Romero, L. 2001. Proline metabolism in response to highest nitrogen dosages in green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv Strike). *J. Plant Physiol* 158:593–598.
- Scandalios, J. G. 1990. Response of plant antioxidant defence genes to environmental stress. *Adv. Genet.* 28:1–41.
- Scandalios, J. G. 2002. The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences.* 27 (9):483-286.
- Scandalios, J. G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.*38:995-1014.
- Scott, I.M., Dat, J.F., López-Delgado, H. and Foyer, C.H. 1999. Salicylic acid and hydrogen peroxide in abiotic stress signaling in plants. *Plant Physiology.* 39:13-17.
- Serraj, R. and T. Sinclair. 2002. Osmolyte accumulation: Can it really help increase in crop yield under drought conditions? *Plant Cell Environ.* 25, 333-341.
- Shahba, Z., Baghizadeh, A., Vakili, S.M., Yazdanpanah, A., Yosefi, M. 2010. The salicylic acid effect on the tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) sugar, protein and proline contents under salinity stress (NaCl). *J. Biophys. Struct. Biol.* 2:35-41.
- Shakirova, F.M. and M.V. Bezrukova. 1997. Induction of wheat resistance against environmental salinization by salicylic acid. *Biology Bulletin.* 24:109–112.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* 53:1305–1319.

- SIAP-SAGARPA. 2012 [En línea], Disponible en <http://www.siap.gob.mx/opt/123/90/89.html> (Consultada el 19/06/13).
- Soto, y Armando, G. F. 2006. El Estado de México confirma su liderazgo en floricultura. En: Información, Planeación, Programación y Evaluación de la Secretaría de Desarrollo Agropecuario del Estado de México. [En línea] Disponible en <http://www.edomexico.gob.mx> (Consultada el 18/06/13).
- Srivastava, M. K.; Dwivedi, U.N. 1998. Salicylic acid modulates glutathione metabolism in pea seedlings. *Journal of Plant Physiology* 153(3-4): 409-414.
- Stevens, J., Senaratna, T., Sivasithamparam, K. 2006. Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): associated changes in gas exchange, water relations and membrane stabilization. *Plant Growth Regul.* 49:77-83.
- Szepesi, A., Csiszár, J., Gémes, K., Horváth, E., Horvath, F., Simon, M., Tari, I. 2009. Salicylic acid improves acclimation to salt stress by stimulating abscisic acid oxidase activity and abscisic acid accumulation, and increase Na⁺ content in leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L. *J. Plant Physiol.* In press.
- Tajdoost, S.; Farboodnia, T.; Heidari, R. 2007. Salt pretreatment enhance salt tolerance in *Zea mays* L. seedlings. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 10 (12): 2086–2090.
- Vanacker, H., Harbinson, J., Carver T.L.W., Foyer, C.H. 1998. Antioxidant defenses of the apoplast. *Protoplasma* 205:129-140.
- Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.* 151:59-66.

- Wen, P.F., Chen, J.Y., Kong, W.F., Pan, Q.H., Wan, S.B., Huang, W.D. 2005. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schravdner, M., Langebartels, C., Van M.C., Inze, D., Van, C.W. 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress in C3 plants. *EMBO J.*, 16:4806-4816.
- Willekens, H., Lange bartels, C., Tire, C., van Montagu, M., Inze, D. and van Camp, V. 1994. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana glauca*. *Plant Mol. Biol.* 24:3-45.
- Yoshida, Y., T., Kiyosue, K., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Zhu, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec.*
- Yusuf, M., Hasan, S.A., Ali, B., Hayat, S., Fariduddin, Q., Ahmad, A. 2007. Effect of salicylic acid on salinity induced changes in *Brassica juncea*. *J. Integr. Plant Biol.* 50(9):1096-1102.
- 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. P: 1-7.
- Zhao, H.J., X.W. Lin, H.Z. Shi, and S.M. Chang, 1995. The regulating effects of phenolic compounds on the physiological characteristics and yield of soybeans. *Acta Agron. Sin.*, 21:351-5

11. ANEXOS

ANEXO 1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MADRE DEL MEDIO DE CULTIVO DE MURASHIGE Y SKOOG (MS, 1962).

Solución.	Fórmula	Cantidad.	Observaciones
Sulfato de magnesio	MgSO ₄	3.7 g de MgSO ₄ en 100 mL de agua destilada.	
	Na ₂ EDTA	0.75 g	*Se disuelven en 20 mL de agua destilada cada uno.
Hierro	Sulfato ferroso	0.55 g	*El EDTA se calienta para disolverse. *Después ambos se aforan a 100 mL.
Tiamina		40 mg en 100 mL de agua destilada.	
Inositol		1 g en 100 mL de agua.	
Pantotenato de calcio		100 mg en 100 mL de agua destilada.	Se debe congelar (de preferencia en pequeñas proporciones para facilitar su uso).
Glicina		10 mg en 100 mL de agua destilada.	

Todas las soluciones se guardan a 4°C y de preferencia en envases de vidrio color ámbar.

Composición química y cantidades requeridas para las sales del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS,1962).

Sustancia	Fórmula	Cantidad para 1000 mL
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	17.5 g
Nitrato de potasio	KNO_3	20 g
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.5 g
Fosfato de potasio	KH_2PO_4	1.75 g
Ácido bórico	H_3BOP_3	50 mg
Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	200 mg
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100 mg
Yoduro de potasio	KI	10 mg
Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.5 mg
Sulfato cúprico 5.0 mg Cloruro de cobalto 5.0 mg	$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $\text{CuCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5 mL de la solución preparada.

*mg (miligramos).

NOTA: De estas dos últimas sustancias se pesan 5 mg de cada una y se disuelven en agua destilada, se aforan a 10 mL y se toma 1 mL para preparar 2 L y 0.5 mL para 1 L.

ANEXO 2. MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG (MS, 1962).

Solución		Para 1000 mL	
Sales		100 mL	
Sulfato de magnesio (Mg SO ₄)		10 mL	
Inositol		10 mL	
Hierro (Fe)		5 mL	
Tiamina		1 mL	
Pantotenato de calcio		2 mL	
Glicina		0.5 mL	
Azúcar		30 g	
Agar –agar		6.0 g	
Agar	Agar bacteriológico	7.5 g	
	Fita gel	Cloruro de magnesio	2.35 g 0.5 mL

Para la preparación del medio de cultivo se sigue el siguiente proceso:

- Se mezclan todas las soluciones (líquidos) en un recipiente.
 - Nota: el pantotenato de calcio se descongela antes de usarlo.
- Posteriormente se agrega el azúcar, dejando agitar hasta que la solución se vea homogénea.
- Se afora la solución a la cantidad requerida.
- Se mide el pH llevando la solución a 5.6-5.7
 - Nota: utilizar hidróxido de potasio (KOH) para subirlo y ácido clorhídrico (HCl) para bajarlo.
- Se agrega el agar y se tapa con clean pack.
- Se calienta la solución para homogenizar el agar.
- Finalmente se sirve en los frascos o tubos a utilizar

ANEXO 3. REACTIVOS

REACTIVO	FÓRMULA	MARCA
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	Sigma
Ácido salicílico		
Ácido 5-sulfosalicílico		
Ácido acético glacial		
Ácido ortofosfórico		
Ácido clorhídrico	HCl	Baker
Ácido tricloroacético TCA	Cl ₃ CCOOH	Baker
Agar-AGAR (POLVO)	-----	Meyer
Ácido de sodio anhidro	NaN ₃	Baker
Carbonato de sodio anhidro	Na ₂ CO ₃	Baker
Cloruro de calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	Baker
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	Baker
Cloruro de magnesio	MgCl ₂ .	Baker
Cloruro de potasio	KCl	Baker
Cloruro de Sodio	(NaCl)	Baker
Cloruro férrico	FeCl ₃ .6H ₂ O	Baker
Dietanolamina (bis-2-Hidroxiethylamida)	C ₄ H ₁₁ NO ₂	Sigma
D-Pantotenato de calcio	C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀	Fluka
DTT Dithiothreitol	(D,L)-1,4-Dithiothreitol	Bio Rad
EDTA (Na ₂ EDTA) sal disódica del ácido etilen dinitrilo tetracético	C ₁₀ H ₁₄ Na ₂ N ₂ O ₈ .2H ₂ O	Baker
Etanol	CHCl ₃	Merk
Fitagel (Phytigel)	-----	Sigma
Fosfato de potasio dibásico	K ₂ HPO ₄	Baker
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	Baker
Fosfato de sodio dibásico	Na ₂ HPO ₄	Baker
Fosfato de sodio monobásico	Na H ₂ PO ₄ .H ₂ O	Baker
Glicina	C ₂ H ₆ NO ₂	Merck y Bio Rad
Guaiacol	C ₇ H ₈ O ₂	Sigma
Hidroxido de potasio	KOH	Baker
Inositol	C ₆ H ₁₅ O ₁₅ P ₃	Merk
L-prolina		
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Baker
Myo-Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	Sigma
Nitrato de amonio	NH ₄ O ₃	Baker

EFFECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA TOLERANCIA A ESTRÉS SALINO EN MICROPLANTAS DE CRISANTEMO
(*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) VARIEDAD POLARIS WHITE

Nitrato de potasio	KNO ₃	Baker
Ninhidrina monohidratada		
PVP Polyvinylpyrrolidone	PVP Povidone	Sigma
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂ al 30%	Baker
Sacarosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Baker
Sulfato de magnesio (7-Hidrato, cristal)	MgSO ₄ .7H ₂ O	Baker
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Baker
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	Baker
Sulfato cúprico	CuSO ₄ .5H ₂ O	Baker
Sulfito se sodio anhidro	Na ₂ SO ₃	
Tiamina Diclorato	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS.xH ₂ O	Merck
Tolueno		
Tween	Tween 20	Boehringer Mannheim
Yoduro de potasio	KI	Baker

ANEXO 4. SOLUCIÓN MADRE DE ÁCIDO SALICÍLICO (AS).

CALCULOS PARA PREPARAR LA SOLUCION DE ÁCIDO SALICÍLICO (AS)

Solución de AS.

$$PM = 138.12 \text{ g/M}$$

$$M = g = 1000\text{mL}$$

Entonces:

$$1M \text{ -----} 138.12\text{g} \text{-----} 1000\text{mL}$$

$$1M = 1000\text{mM}$$

Concentraciones a utilizar: 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}

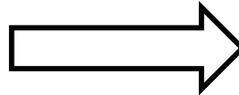
$$10^{-4} = 0.0001 \text{ M} = 0.1 \text{ mM} = 100 \mu\text{M}$$

$$10^{-5} = 0.00001 \text{ M} = 0.01 \text{ mM} = 10 \mu\text{M}$$

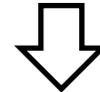
$$10^{-6} = 0.000001 \text{ M} = 0.001 \text{ mM} = 1 \mu\text{M}$$

Dónde:

$$\begin{array}{l} 138.12 \text{ g} \text{ -----} 1000\text{mM} \\ X \text{-----} 0.1 \text{ mM} \\ X = 0.0138112\text{g} / \text{L} \end{array}$$



$$\begin{array}{l} = 0.0138112\text{g} \text{ -----} 1000\text{mL} \\ X \text{-----} 200\text{mL} \\ X = 0.002724\text{g} = 2.762\text{mg} \end{array}$$



$$\begin{array}{l} 10^{-4} = 0.1 \text{ mM} = 2.762\text{mg} \\ 10^{-5} = 0.01 \text{ mM} = 0.2762\text{mg} \\ 10^{-6} = 0.001 \text{ mM} = 0.02762\text{mg} \end{array}$$

SOLUCIÓN MADRE EN 40 mg/100 mL

El AS se disuelve en hidróxido de potasio (KOH); solo un poco y se afora a la cantidad requerida con agua destilada.

Para:

10^{-4} M	10^{-5} M	10^{-6} M
40 mg -----100mL	40 mg -----100mL	40 mg -----100mL
2.762 mg-----X	0.2762 mg-----X	0.02762 mg-----X
X= 6.905 mL o	X= 0.6905 mL o	X= 0.06905 mL o
6,905 μL	690.5 μL	69.05 μL

ANEXO 5. EQUIPO.

EQUIPO	MARCA Y/O ESPECIFICACIONES
Autoclave	Horizontal; Marke Forge
Agitador magnético	Cleaver Scientific Ltd
Baño maría	Stable Temp™ Cole-Parmer PN:WA02C11B
Báscula analítica	ae ADAM PGW 153e
	ae ADAM PGW 124e
Centrifuga	Eppendorf. 22331Hamburg
	Eppendorf 5707
Campana de flujo laminar	Edge Gard The Baker Company.
Espectrofotómetro	Jenway modelo 6405 UV/vis.
NanoDrop®	ND-1000
Potenciómetro	HANNA Instruments HI 2211
Vórtex	LSE™, 3 400 rpm

**ANEXO 6. RESUMEN EN EXTENSO DEL XVII CONGRESO INTERNACIONAL
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS. “Agricultura Sustentable: uso eficiente del agua,
suelo y fertilizantes”.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Instituto de Ciencias Agrícolas



**XVII CONGRESO INTERNACIONAL DE CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

MEMORIAS

Mexicali Baja California México

9 y 10 de octubre del 2014



Universidad Autónoma de Baja California
Instituto de Ciencias Agrícolas
Facultad de Ingeniería y Negocios San Quintín

Universidad de Sonora
Departamento de Agricultura y Ganadería

Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Agronomía

otorgan la presente
Constancia

A: Fuentes Ayón Juan

Por su participación como PONENTE con el Tema "EFECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA TOLERANCIA A ESTRÉS OSMÓTICO EN MICROPLANTAS DE CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflora*) VARIEDAD POLARIS WHITE", en el XVII Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas.

Mexicali, Baja California, octubre de 2014
"Por la realización plena del hombre"

F. Escoboza
Dr. Luis Fernando Escoboza García
Presidente

Fidel Núñez R.
Dr. Fidel Núñez Ramírez
Secretario

GobBC Secretaría de Fomento Agropecuario
SAGARPA Secretaría de Agricultura, Gananería y Desarrollo Rural
inirap Instituto Mexicano de Investigación y Tecnología Agropecuaria
MEXICALI Ayuntamiento de Mexicali
CONAFOR Comisión Nacional Forestal
JOHN DEERE
Gowad MEXICANA

EFFECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA TOLERANCIA A ESTRÉS SALINO CON NaCl EN MICROPLANTAS DE CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflora*) VARIEDAD POLARIS WHITE.

Fuentes-Ayón, Juan Manuel¹; Mora-Herrera, Martha Elena¹; Gomora-Rasso, Janet; Herrera-Martínez Silvia Lizbeth; De la Cruz-Linares, Nohemi; Rogel-Millán, Gloria.

¹Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México. km 1.5, Carretera Tenancingo-Villa Guerrero, Estado de México, C.P. 52400, México. Tel. 01 714 140 77 24, Ext. 176, FAX. 01 714 140 77 25. E-mail: marthaelenam@gmail.com

Resumen

El experimento se llevó a cabo en microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white en condiciones *in vitro* para evaluar el efecto del ácido salicílico (AS) en la tolerancia al estrés salino por cloruro de sodio (NaCl). Las microplantas incubadas en NaCl disminuyeron el crecimiento y a la supervivencia con respecto al testigo 0.0 mM de NaCl, siendo el tratamiento de 200 mM de NaCl el que disminuyó hasta un 60% la supervivencia. Los tratamientos de AS generaron inhibición del crecimiento en tallo, raíz, con respecto al testigo, siendo la concentración de 10^{-4} M de AS que presentó un 51.3%. Posteriormente del pretratamiento con AS se trasplantaron a medio MS con 150 mM de NaCl de manera general, observándose cambios significativos en el desarrollo y número de raíces.

Palabras claves: NaCl, supervivencia, crisantemo

Abstract

The experiment was conducted in microplants chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*) Polaris white variety of *in vitro* conditions to evaluate the effect of salicylic acid (SA) on tolerance to salt stress by sodium chloride (NaCl). The microplants incubated in NaCl decreased growth and survival relative to 0.0 mM NaCl witness, still the treatment of 200 mM NaCl which decreased to 60% survival. AS treatments generated growth inhibition in stem, root, relative to the control, the concentration of 10^{-4} M AS I present 51.3%. Subsequently AS pretreatment were transplanted to MS medium containing 150 mM NaCl generally observed significant changes in the number of root development.

Key words: NaCl, survival, chrysanthemum.

Introducción

El cultivo de crisantemo, al igual que la mayoría de cultivos de importancia alimenticia y/o económica, es susceptible a un gran número de plagas y enfermedades que ocasiona pérdidas económicas (Mendoza, 2002). Además, existen factores ambientales adversos que afectan el rendimiento como la salinidad (Brayet *al.*, 2000; Scandalios, 2005). Otro factor importante es el uso excesivo de agroquímicos y la utilización de agua residuales para riego, las sales introducidas por el agua de riego se acumulan en las raíces especialmente cuando la lixiviación es escasa (Rengasamy, 2006). El exceso de sales alteran los procesos fisiológicos tales como: la germinación de semilla, crecimiento y desarrollo, que reducen la productividad de la planta (Ashraf, 2004). También, la salinidad induce modificaciones metabólicas y daño celular (Misra y Saxena, 2009).

El principal efecto de las sales sobre la fisiología de las plantas es a nivel osmótico e iónico (Munns, 2002). La acumulación de sales en la zona radicular provoca el descenso del potencial

hídrico del suelo y dificulta la absorción de agua y nutrientes; pero la planta, a través de diferentes mecanismos, consigue restablecer el balance osmótico. Es en este punto cuando la absorción de las sales y su incorporación a los tejidos llevan a la aparición del efecto iónico que provocará diferentes daños en la planta dependiendo, por una parte de la sensibilidad del genotipo a las sales y, por otro, de la especie iónica implicada (Munns, 2002). Se ha reportado que la capacidad de algunas plantas para contrarrestar el estrés ocasionado por el exceso de sales, está ligado al incremento de antioxidantes y producción de osmolitos (Chen y Murata, 2002).

Actualmente se estudia la tolerancia a estrés abiótico empleando moléculas señal tales como: ácido ascórbico (AA), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido salicílico (AS), ácido abscísico (ABA) entre otros (Foyer CH y Lopez-Delgado, *et al.*, 1997, Foyer y Lelandais, 1993, López-Delgado *et al.*, 2007). El AS es un regulador del crecimiento, que participa en el crecimiento y desarrollo de las plantas, además, es una molécula de señalización importante, ya que tiene efectos diversos sobre la tolerancia al estrés biótico y abiótico (López-Delgado *et al.*, 2007). Algunos estudios indican que el AS incrementa la resistencia a la salinidad en plántulas de trigo tomate y maíz (Shakirova y Bezrukova, 1997, Stevens *et al.*, 2006, Gunes *et al.*, 2007) y al déficit de agua (Bezrukova *et al.*, 2001). Al parecer actúa como un regulador sobre el balance de óxido/reducción de las células vegetales, induce respuestas adaptativas, fisiológicas y morfológicas en las plantas. Además se ha reportado que regula la actividad de la catalasa y otras enzimas antioxidantes encargadas de desintoxicar del exceso de oxidación, generado por el estrés. (Raskin, 1992).

Muchos estudios han demostrado que la aplicación exógena de AS a las plantas, bajo estrés salino, mejora los procesos de crecimiento y regresa rápidamente a su condición normal (Yusuf *et al.*, 2007; Misra y Sazená, 2009). En plantas de maíz se encontró que en hojas tratadas con AS incrementaron los contenidos de clorofila *a*, *b* y carotenoides en condiciones de estrés salino lo que mejora su condición fisiológica (Khodary, 2004).

Por lo que el objetivo de esta investigación fue, evaluar el efecto del ácido salicílico en la inducción de tolerancia a la salinidad en microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white.

Materiales y métodos

Esta investigación se realizó en el Centro Universitario UAEM Tenancingo, Edo de Méx. El material biológico utilizado, fueron microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white, obtenidas del Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal de este Centro.

Efecto del NaCl sobre microplantas de crisantemo. Yemas axilares (5 mm) de crisantemo se cultivaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 0, 50, 100, 150 y 200 mM de NaCl durante 28 ± 2 días; y se evaluó: supervivencia, número de hojas, longitud de raíz y tallo (cm), y peso fresco (mg). Para conocer las respuestas al NaCl de esta especie en condiciones *in vitro*.

Efecto del AS sobre microplantas de crisantemo. Yemas axilares de crisantemo se cultivaron en medio MS con 0, 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} M de AS durante 28 ± 2 días (Etapa 1) y se evaluó: número de hojas, longitud de raíz y tallo (cm), y peso fresco (mg).

Efecto del AS sobre microplantas incubadas en NaCl. Las microplantas preincubadas en AS fueron trasplantadas sin raíz en medio MS con 150 mM de NaCl (Etapa 2) por 28 ± 2 días. En las que se evaluó: número de hojas, longitud de raíz y tallo (cm), y peso fresco (mg).

El diseño experimental fue de bloques al azar con 12 plantas por tratamiento. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de t Student ($P \leq 0.05$).

Resultados y discusión

Efecto del NaCl sobre microplantas de crisantemo.

Las microplantas incubadas en MS con NaCl durante 28 ± 2 días, disminuyeron el crecimiento (logitud de tallo y raíz, número de hojas y peso fresco) y la supervivencia con respecto al testigo; siendo la concentración de 200 mM de NaCl la que disminuyó hasta un 60% (Fig. 1, Tabla 1).

Estos resultados concuerdan con los de Ghoulam *et al.* (2001), que mostró que la salinidad por NaCl en altas concentraciones, causó reducción en los parámetros de crecimiento de área foliar, peso fresco y seco, de los brotes y las raíces de plantas de remolacha azucarera, afectando además las células originando fluido celular. cabe mencionar que la concentración de sal fue agregada al suelo junto con la fertilización, por lo que no se afectó la supervivencia como en el caso del crisantemo, estos resultados además, indican que el crisantemo es altamente tolerante a la salinidad (NaCl), considerando que estuvo bajo estrés 20 ± 2 días.

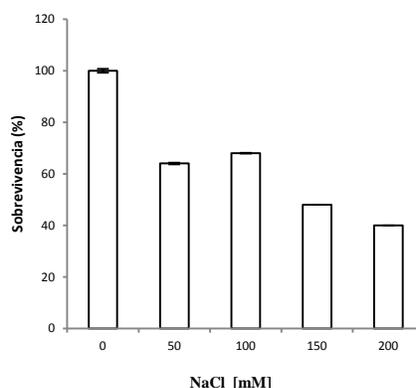


Figura 1. Supervivencia de microplantas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white, incubadas en NaCl, después de 28 ± 2 días. Los resultados obtenidos son de 7 repeticiones.

Tabla 1. Efecto del NaCl sobre microplantas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white.

Tratamientos de NaCl [mM]	Raíz (cm)	Log. Tallo (cm)	No. Hojas	Peso Fresco (mg)	% de supervivencia 28 ± 2 días
0	4.452 ± 0.73	2.208 ± 0.32	5.2 ± 0.44	202 ± 25.6	100.00
50	1.71875 ± 0.30	1.24375 ± 0.19	4.125 ± 0.42	151.769 ± 24.2	64.00
100	0.34118 ± 0.1	1.17647 ± 0.28	3.23529 ± 0.36	121.676 ± 18.5	66.00 *
150	0.13333 ± 0.04	0.20833 ± 0.04	2.83333 ± 0.28	54.875 ± 6.29	48.00 *
200	0 ± 0	0.16 ± 0.02	1.8 ± 0.19	47.46 ± 5.32	40.00

Los datos son el promedio de 28 plantas \pm e.s.

Efecto de AS sobre microplantas de crisantemo.

Las microplantas preincubadas con AS durante 28 ± 2 días (Etapa 1) mostraron inhibición del crecimiento en tallo, raíz, y peso fresco, siendo la concentración de 10^{-4} M de AS, que presentó hasta un 51.3% de inhibición (Tabla 2). Además, se ha observado que los salicilatos pueden causar severos daños a las plantas porque disminuyen el proceso fotosintético, la conductividad estomática

y la transpiración, lo que ocasiona estrés (Janda *et al.*, 2000); posiblemente esto es lo que origina la disminución del crecimiento de tallo y raíces en las microplantas de crisantemo.

Es importante destacar, que el efecto en el crecimiento por los salicilatos genera una aclimatación que hace tolerante a las plantas cuando son sometidas a otro tipo de estrés (tolerancia inducida) (Gong *et al.*, 2001). Los efectos inhibitorios del crecimiento por los salicilatos, también fueron observados en microplantas de papa (López-Delgado *et al.*, 1998).

Tabla 2. Evolución del crecimiento en microplantas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white, incubadas en AS.

Tratamientos de AS [M]	Raíz (cm)	Log. Tallo (cm)	No. Hojas	Peso Fresco (mg)
0	3.67 ± 0.5	2.51 ± 0.26	5.26471 ± 0.34	0.18767 ± 0.011
10-6	3.29 ± 0.47	2.04 ± 0.25	4.61765 ± 0.36	0.15186 ± 0.008
10-5	3.09 ± 0.47	2.01 ± .25	4.87097 ± 0.41	0.15739 ± 0.016
10-4	1.01 ± 0.42	1.72 ± .17	4.9 ± 0.4	0.11028 ± 0.007

Los datos son el promedio de 36 plantas ± e. s.

Efecto del pretratamiento en AS de microplantas de crisantemo expuestas a NaCl.

Las microplantas del pretratamiento de AS fueron trasplantadas sin raíz a MS con 150 mM de NaCl durante 28±2 días (Etapa 2).

De manera general, el pretratamiento de AS no presenta diferencias con el testigo, lo que indica la alta tolerancia de las plantas de crisantemo a la salinidad, por otro lado es importante mencionar que, si bien, en el modelo sugerido se obtuvo que la concentración de 150 mM de NaCl disminuía hasta un 52% la supervivencia; esto no sucedió al trasplantar las plantas completas a NaCl, posiblemente esta respuesta se deba, a que, la supervivencia fue evaluada con microplantas desarrolladas de esqueje, mientras que la evaluación del pretratamiento de AS y evaluación de NaCl, fue en plantas completas, (Tabla 3).

Aunque, es importante destacar que hubo mayor desarrollo y número de raíces de las plantas preincubadas en AS además de ser más vigorosas que el control (gruesas) (Fig. 2).

Tabla 3. Crecimiento en microplantas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white, preincubadas en AS, trasplantadas en NaCl.

Pretratamiento de AS [M]	Raíz (cm)	Log. Tallo (cm)	No. Hojas	Peso Fresco (mg)
0	5.88571 ± 0.52	8.05714 ± 0.66	11 ± 0.57	0.80321 ± 0.05
10 ⁻⁶	6.81034 ± 0.49	6.43793 ± 0.68	10.0345 ± 0.73	0.55793 ± 0.06
10 ⁻⁵	6.69231 ± 0.54	7.44231 ± 0.64	10.8846 ± 0.79	0.58788 ± 0.06
10 ⁻⁴	5.68077 ± 0.46	7.93462 ± 0.46	10.7308 ± 0.46	0.70173 ± 0.04

Los datos son el promedio de 36 plantas ± e. s.



Figura 2. Desarrollo de raíces de microplantas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white, preincubadas en AS trasplantadas en NaCl (150 mM): A) 0, B) 10^{-6} , C) 10^{-5} y D) 10^{-4} M de AS.

Conclusiones

El crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white, es resistente a altas concentraciones de salinidad por NaCl.

El pretratamiento de AS en microplantas de crisantemo incrementa el número y grosor de raíces.

Literatura citada

- Ashraf M. 2004. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora* 199:361–76.
- Bray EA, Bailey-Serres J and Weretilnyk. 2000. Responses to abiotic stresses. In Buchanan B, Gruissem W and Jones R, ed. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA. American Society of plant physiologist Press. pp. 1158-1203.
- Bezrukova, M.V, R. Sakhabutdinova, R A. Fatkhutdinova, I. Kyldiarova and F. Shakirova. 2001. The role of hormonal changes in protective action of salicylic acid on growth of wheat seedlings under water deficit. *Agrochemiya (Russ)*. 2:51–54.
- Chen. T y N. Murata. 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Plant Biol.* 5, 250-257.
- Foyer CH and Lelandis M. 1993. The roles of ascorbate in the regulation of photosynthesis. In *Photosynthetic Responses to the Environment* (ed. H.Y. Yamamoto). American Society of Plant Physiologists. Rockville. Pp 88-101.
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF and Scott IM. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiologia Plantarum*. 100:241-254.
- Gunes A, Inal A, Alpaslan M, Eraslan F, Bagci EG, Cicek N. 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *J. Plant Physiol.* 164:728-736.
- Gong M, B Chen, Z G Li, L H Guo (2001) Heat –shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedling and involvement of H₂O₂. *J. Plant Physiol.* 158:1125-1130.
- Ghoulam, C., F. Ahmed and F. Khalid, 2001. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environ. Exp. Bot.*, 47: 139–50
- Khodary, S.E.A., 2004. Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis, and carbohydrate metabolism in salt-stressed maize plants. *J. Agric. Biol.* 6, pp. 5-8.
- López-Delgado H A, Scott IM, and Mora-Herrera Me. 2007. Stress and antistress effects of salicylic acid and acetyl salicylic acid on potato culture technology. In Hayat S. and Ahmad A. ed. *Salicylic acid a plant hormone*. Netherlands Springer Press pp. 163-195.
- López-Delgado H, J F Dat, C H Foyer, I M Scott (1998) Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. *J. Exp. Bot.* 49 (321):713-720.
- Mendoza, Z. C. 2002. Fungicidas en ornamentales Pp. 119-120. En: Bautista M.N, J. Alvarado, J.C. Chavarín, H. Sánchez. (eds). *Manejo Fitosanitario de Ornamentales*. Instituto de Fitosanidad y Colegia de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 237 p
- Misra N, Saxena P. 2009. Effect of salicylic acid on proline metabolism in lentil grown under salinity stress. *Plant Sci.* 177:181-189.
- Misra N, Saxena P. 2009. Effect of salicylic acid on proline metabolism in lentil grown under salinity stress. *Plant Sci.* 177:181-189.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 239-250.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Raskin, I., 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology*. 43, pp. 439-463.
- Rengasamy P 2006. World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany* 57: 1017-1023.
- Scandalios JG. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38:995-1014.
- Shakirova F.M. and M.V. Bezrukova. 1997. Induction of wheat resistance against environmental salinization by salicylic acid. *Biology Bulletin*. 24:109–112
- Stevens J, Senaratna T, Sivasithamparam K (2006). Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): associated changes in gas exchange, water relations and membrane stabilization. *Plant Growth Regul.* 49:77-83.
- Yusuf M, Hasan SA, Ali B, Hayat S, Fariduddin Q, Ahmad A, 2007. Effect of salicylic acid on salinity induced changes in *Brassica juncea*. *J. Integr. Plant Biol.* 50(9):1096-1102.



EFFECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA TOLERANCIA A ESTRÉS SALINO POR NaCl EN MICROPLANTAS DE CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflora*) VARIEDAD POLARIS WHITE

Fuentes-Ayón, Juan Manuel; Rogel-Millán, Gloria; Gomora-Rasso, Janet; Herrera-Martínez Sílvia Lizbeth; De la Cruz-Linares, Nohemi; Mora-Herrera, Martha Elena.

Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México, km 1.5, Carretera Tenancingo-Villa Guerrero, Estado de México, C.P. 52400, México. Tel. 01 714 140 77 24, Ext. 176, FAX. 01 714 140 77 25. E-mail: marthaelenam@gmail.com

Introducción

El cultivo de crisantemo, es susceptible a estrés biótico (8) y abiótico, como la salinidad (2, 11), que puede ser provocada por el uso excesivo de agroquímicos y la utilización de agua residuales para riego (10). El exceso de sales alteran los procesos fisiológicos (1). Actualmente se estudia la tolerancia a estrés abiótico empleando moléculas señal tales como: ácido salicílico (AS), entre otros (7). Algunos estudios indican que el AS incrementa la resistencia a la salinidad en plántulas de trigo, tomate y maíz (12, 13, 3).

Por lo que el objetivo de esta investigación fue, evaluar el efecto del ácido salicílico en la inducción de tolerancia a la salinidad en microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white.

Materiales y métodos

Se utilizaron microplantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white, obtenidas del Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal del CUT.

Efecto del NaCl sobre microplantas de crisantemo. Yemas axilares de crisantemo se cultivaron en medio MS (Murashige y Skoog, 9) con 0, 50, 100, 150 y 200 mM de NaCl durante 28±2 días; y se evaluó: supervivencia, número de hojas, longitud de raíz y tallo (cm), y peso fresco (mg). Para conocer las respuestas al NaCl de esta especie en condiciones *in vitro*.

Efecto del AS sobre microplantas de crisantemo. Yemas axilares de crisantemo se cultivaron en medio MS con 0, 10⁻⁶, 10⁻⁵ y 10⁻⁴ M de AS durante 28±2 días (Etapa 1) y se evaluó: número de hojas, longitud de raíz y tallo (cm), y peso fresco (mg).

Efecto del AS sobre microplantas incubadas en NaCl. Las microplantas preincubadas en AS fueron trasplantadas sin raíz en medio MS con 150 mM de NaCl (Etapa 2) por 28±2 días. En las que se evaluó: número de hojas, longitud de raíz y tallo (cm), y peso fresco (mg).

El diseño experimental fue de bloques al azar con 12 plantas por tratamiento.

Resultados y discusión

Efecto del NaCl sobre microplantas de crisantemo.

Las microplantas incubadas en MS con NaCl durante 28±2 días, disminuyeron el crecimiento (longitud de tallo y raíz, número de hojas y peso fresco) y la supervivencia con respecto al testigo; siendo la concentración de 200 mM de NaCl la que disminuyó hasta un 60% (Tabla 1), Se ha demostrado que la salinidad por NaCl en altas concentraciones, causa reducción en los parámetros de crecimiento en plantas de remolacha azucarera (5); la concentración de sal fue agregada al suelo junto con la fertilización, por lo que no se afectó la supervivencia como en el caso del crisantemo, estos resultados además, indican que el crisantemo es altamente tolerante a la salinidad (NaCl).

Tabla 1. Efecto del NaCl sobre microplantas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white.

Tratamientos de NaCl [mM]	Raíz (cm)	Log. Tallo (cm)	No. Hojas	Peso Fresco (mg)	% de supervivencia 28±2 días
0	4.452 ± 0.73	2.208 ± 0.32	5.2 ± 0.44	202 ± 25.6	100.00
50	1.71875 ± 0.30	1.24375 ± 0.19	4.125 ± 0.42	151.769 ± 24.2	64.00
100	0.34118 ± 0.1	1.17647 ± 0.28	3.23529 ± 0.36	121.676 ± 18.5	66.00 *
150	0.13333 ± 0.04	0.20833 ± 0.04	2.83333 ± 0.28	54.875 ± 6.29	48.00 *
200	0 ± 0	0.16 ± 0.02	1.8 ± 0.19	47.46 ± 5.32	40.00

Los datos son el promedio de 28 plantas ± e. s.

Efecto de AS sobre microplantas de crisantemo.

Las microplantas preincubadas con AS durante 28±2 días (Etapa 1) mostraron inhibición del crecimiento en tallo, raíz, y peso fresco, siendo la concentración de 10⁻⁴ M de AS, que presentó hasta un 51.3% de inhibición (Tabla 2). Se ha observado que los salicilatos pueden causar severos daños a las plantas porque disminuyen el proceso fotosintético, la conductividad estomática y la transpiración, lo que ocasiona estrés (6); posiblemente esto es lo que origina la disminución del crecimiento de tallo y raíces en las microplantas de crisantemo. El efecto en el crecimiento por los salicilatos genera una aclimatación que hace tolerante a las plantas cuando son sometidas a un tipo de estrés (4).

Tabla 2. Evaluación del crecimiento en microplantas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white, incubadas en AS.

Tratamientos de AS [M]	Raíz (cm)	Log. Tallo (cm)	No. Hojas	Peso Fresco (mg)
0	3.67 ± 0.5	2.51 ± 0.26	5.26471 ± 0.34	0.18767 ± 0.011
10 ⁻⁶	3.29 ± 0.47	2.04 ± 0.25	4.61765 ± 0.36	0.15186 ± 0.008
10 ⁻⁵	3.09 ± 0.47	2.01 ± .25	4.87097 ± 0.41	0.15739 ± 0.016
10 ⁻⁴	1.01 ± 0.42	1.72 ± .17	4.9 ± 0.4	0.11028 ± 0.007

Los datos son el promedio de 36 plantas ± e. s.

Efecto del pretratamiento en AS de microplantas de crisantemo expuestas a NaCl.

Las microplantas del pretratamiento con AS, fueron trasplantadas sin raíces a MS con 150 mM de NaCl durante 28±2 días (Etapa 2), de manera general, el pretratamiento de AS no presenta diferencias con el testigo, lo que indica la alta tolerancia de las plantas de crisantemo a la salinidad, por otro lado es importante mencionar que, si bien, en el modelo sugerido se obtuvo que la concentración de 150 mM de NaCl disminuía hasta un 52% la supervivencia; esto no sucedió al trasplantar las plantas completas a NaCl, posiblemente esta respuesta se deba, a que, la supervivencia fue evaluada con microplantas desarrolladas de esqueje, mientras que la evaluación del pretratamiento de AS y de NaCl (Etapa 2), fue en plantas completas, que posiblemente son más tolerantes. Aunque, es importante destacar que hubo mayor desarrollo y número de raíces de las plantas preincubadas en AS, además, de ser más vigorosas (gruesas) que las del control (Fig. 1).



Figura 1. Desarrollo de raíces de microplantas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white, preincubadas en AS trasplantadas en NaCl (150 mM): A) 0, B) 10⁻⁶, C) 10⁻⁵ y D) 10⁻⁴ M de AS.

Conclusiones

- El crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) variedad Polaris white, es resistente a altas concentraciones de salinidad por NaCl.
- El pretratamiento de AS en microplantas de crisantemo incrementa el número y grosor de raíces.

BIBLIOGRAFÍA

- Ashraf M. 2004. *Flora* 199:361-76.
- Bray EA, Bailey-Serres J and Weretilnyk. 2000. *Society of plant physiologist Press*, pp. 1158-1203.
- Gunes A, Inal A, Alpaslan M, Eraslan F, Bagci EG, Cicek N. 2007. *PlantPhysiol*. 164:728-736.
- Gong M, B Chen, Z G Li, L H Guo (2001). *Plant Physiol*. 158:1125-1130.
- Ghoulam C., F. Ahmed and F. Khalid. 2001. *Environ. Exp. Bot.*, 47: 139-50
- Janda T, G Saliu, Z Antonovics, E Horvath, E Páldi (2000). *Maydica* 45:29-33.
- López-Delgado H A, Scott IM, and Mora-Herrera Me. 2007. *Springer Press* pp. 163-195.
- Mendoza, Z. C. 2002. *Manejo Fitosanitario de Ornamentales*. 237 p
- Murashige T, Skoog F. 1962. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Rengasamy P. 2006. *Experimental Botany* 57: 1017-1023.
- Scandalos JG. 2005. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38:995-1014.
- Shakirova FM, and M.V. Bezrukova. 1997. *Biology Bulletin*. 24:109-112
- Stevens J, Senarathna T, Sivasithamparam K (2006). *Plant Growth Regul.* 49:77-83.



XVII Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas