

**RESIDUALIDAD DEL ACIDO SALICÍLICO Y SU EFECTO  
EN LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA Y CAPACIDAD  
ANTIOXIDANTE TOTAL EN TOMATE (*Solanum  
lycopersicum* L.)**

ENRIQUE GUZMÁN TELLEZ

**TESIS**

Presenta como requisito parcial para  
obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN HORTICULTURA**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México  
Junio del 2012

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO**

**Residualidad del ácido salicílico y su efecto en la actividad de la catalasa y capacidad antioxidante total en tomate (*Solanum lycopersicum* L.)**

**Por**

**Enrique Guzmán Téllez**

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como requisito parcial para optar al grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
HORTICULTURA**

**COMITÉ PARTICULAR**

Asesor principal:

Dr. Adalberto Benavides Mendoza

Asesor:

Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Asesor:

Dr. Homero Ramírez Rodríguez

Asesor:

Dr. Alberto Flores Olivas

Asesor:

Dr. Daniel Díaz Montenegro

Dr. Fernando Ruiz Zarate  
Subdirector de posgrado

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, Junio del 2012**

## **DEDICATORIAS**

**A mis hijos Diego y Danna por ser el motor que me impulsa**

**A mi esposa Ana Delia por acompañarme en esta nueva etapa de mi vida**

**A mi hermano Augusto por ser el amigo incondicional**

**A mis padres Judith y Enrique por apoyarme en todo momento y haberme enseñado que la fórmula para conseguir lo que se quiere, es el trabajo constante y bien hecho**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Daniel Díaz Montenegro y al Ing. Sergio Acosta por demandarme ser mejor cada día y ser ellos el ejemplo de superación a seguir en el ámbito profesional y laboral.

Al Dr. Adalberto Benavides por aceptar dirigir este proyecto, plantear las bases para su realización y ser la guía, así como sus valiosas recomendaciones, sugerencias y clara asesoría. Del mismo modo le agradezco el dejar claro en mí, que para aprender hay que leer.

A la Dra. Rosalinda Mendoza por todo el tiempo y apoyo brindado, sus sugerencias y observaciones oportunas.

Al Dr. Homero Ramírez y Dr. Alberto Flores por el apoyo durante la ejecución de este proyecto.

A la M.C. Hermila García y la M.C. Erika Rivas del laboratorio de fisiología vegetal, al Ing. Juan Manuel (encargado del invernadero), al Dr. Valentín Robledo, todos ellos del departamento de horticultura de la universidad. A la M.C. Marisol, al Dr. Edmundo Rodríguez y a la Dra. Susana Gonzales del área de ciencias básicas. Al M.C. Ascasio y al Dr. Cristóbal de la U.A. de C. A todos ellos les agradezco el apoyo y amistad que me brindaron de forma desinteresada en la realización de este proyecto.

A mis compañeros de generación William y Juan, por los dos años que convivimos de manera grata.

## COMPENDIO

# RESIDUALIDAD DEL ACIDO SALICÍLICO Y SU EFECTO EN LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)

Por

**Enrique Guzmán Téllez**

**MAESTRIA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, Junio del 2012.**

**Dr. Adalberto Benavides Mendoza –Asesor–**

**Palabras clave:** *ácido salicílico, catalasa, antioxidantes, inductores de tolerancia, elicitores.*

El objetivo de este estudio fue determinar el cambio en el tiempo de la concentración de ácido salicílico (AS), así como el cambio en el contenido catalasa (CAT) y la capacidad antioxidante total (ANT) estimulados por la aplicación y residualidad del AS en el tejido foliar de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en invernadero bajo dos condiciones de salinidad (0 y 100 mM de NaCl) y la repercusión de estos componentes sobre el peso de fruta. El experimento se dividió en dos etapas: (1) aplicación foliar en plántulas de tomate de AS a  $10^{-4}$  M y agua destilada como control, y posterior determinación del AS en el tejido foliar cada 48 hrs, y (2) aplicación foliar en plantas adultas de tomate de AS a  $10^{-4}$  M y un control a base de agua destilada, en dos condiciones de desarrollo 0 y 100 mM de NaCl, y posterior determinación de AS y CAT a las 12, 24, 48, 144 y 240 h, así como ANT a las 48 y 144 h después de la aplicación.

Dos días después de una primera aplicación (en plántulas de 30 días de edad) la concentración de AS foliar alcanzó un máximo de  $8 \mu\text{g g}^{-1}$ , el doble de lo observado en el testigo. Esta concentración disminuyó paulatinamente hasta que ocho días después igualó al testigo. Una segunda aplicación realizada en plantas de 42 días de edad mostró prácticamente la misma respuesta, pero con la diferencia de que la disminución del AS fue muy rápida, igualando a la concentración del testigo en dos días. La aplicación de AS bajo las condiciones de este ensayo no presentó ningún beneficio al peso de raíz y tallo, aún en los momentos cuando se presentó la mayor concentración en el tejido.

En plantas adultas, la concentración de AS en el tejido foliar mostró un comportamiento dinámico similar al encontrado en plántulas (con valores superiores a los  $12 \mu\text{g g}^{-1}$  de AS en el tejido), así mismo, algo similar ocurrió con el contenido de CAT y ANT días después de la aplicación, incrementando el valor de estos compuestos a las 24 h, alcanzando sus valores máximos a las 48 para caer a las 48 ó 144 h. Aplicaciones posteriores de AS se comportaron de forma similar, aunque con mayor tiempo de residualidad del AS en el tejido foliar (tiempos de 24, 48 y 144 h para la primera, segunda y tercera aplicación respectivamente). La condición salina utilizada (100 mM de NaCl) por sí sola no mostró efecto sobre la dinámica del AS y CAT, sin embargo mostró reducción en el peso de fruta. La aplicación de AS foliar sin estrés manifiesto (0 mM de NaCl), presentó incrementos en CAT, ANT y AS de forma significativa, así mismo la aplicación de AS bajo condiciones de salinidad (100 mM de NaCl) presentó los valores más elevados de CAT, ANT y AS, sin embargo no indujo cambios en el peso de fruta con respecto al testigo salino. Lo anterior indica que el efecto residual del AS al aplicarse cada 15 días a  $10^{-4}$  M, induce una dinámica con valores significativos de moléculas relacionadas con tolerancia al estrés (CAT, ANT y el mismo ácido salicílico) que incrementan peso de fruta sin estrés manifiesto, sin ser así bajo una condición salina 100 mM de NaCl.

## ABSTRACT

# RESIDUALITY OF SALICYLIC ACID AND ITS EFFECT ON THE CATALASA ACTIVITY AND TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY IN TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.)

By

**Enrique Guzmán Téllez**

**MASTER OF SCIENCE IN HORTICULTURE  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, Junio del 2012.**

**Dr. Adalberto Benavides Mendoza –Adviser–**

**Key words:** *salicylic acid, catalase, antioxidants, tolerance inducing, elicitors.*

The aim of this study was to determinate the change in the time of the concentration of salicylic acid (SA), as well as the change of catalase activity (CAT) and total antioxidant capability (ANT) stimulated by the application and residuality of SA on leaf tissue of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) into greenhouse under two salinity conditions (0 y 100 mM de NaCl) and the repercussion of this components under the fruit weigh. The experiment was divided into two phases: (1) spraying on tomato seedlings of SA to  $10^{-4}$  M and water as control, and a post evaluation of SA into the leaf tissue every 48 h, and (2) spraying on tomato plants of SA to  $10^{-4}$  M and water as control, under two salinity conditions (0 y 100 mM de NaCl), and next, the determination of SA and CAT at 12, 24, 48, 144 y 240 h, and ANT at 48 and 144 h after application.

Two days after the first application in seedlings (30 days old plants) the SA foliar concentration reached a maximum of  $8 \mu\text{g g}^{-1}$ , i. e. twice the amount observed in the control plant. This concentration gradually decreased until it

reached the level of control plants eight days later. A second application showed actually the same response, but with a difference, the decrease in SA was very fast, equaling the concentration of the control in two days. The SA application under the conditions of this assay did not cause any differences in the root and stem weights, not even at the moments it showed the highest concentration in the tissue.

In plants, the concentration of SA in leaf tissue showed a dynamic behavior similar to that found in seedlings (with values higher than  $12 \mu\text{g g}^{-1}$  of SA in the tissue), at the same time something similar showed the CAT and ANT days after spraying, increasing the value at 24 h, achieves its maximum values at 48 h to decrease to 24 or 144 h. Subsequent applications of SA had the same behavior, but with more time of residuality into the leaf tissue (times of 24, 48 and 144 h to the first, second and third application respectively). The salinity condition (100 mM de NaCl) alone didn't show effect on the dynamic of SA and CAT, but it showed reduction on the fruit weight. The application of SA without manifest stress (0 mM NaCl) showed significative increases in CAT, ANT, AS and fruit weight, but on the other hand the application of SA under salinity conditions (100 mM NaCl) showed the highest values in CAT, ANT y AS, nevertheless it didn't induce changes in the fruit weight with respect to control. This indicates that the residual effects of SA when it's sprayed every 15 days to  $10^{-4}$  M, induces a dynamic with significative values of molecules related with stress tolerance (CAT, ANT and the same SA) that increase fruit weight under condition without stress, without being well under saline condition of 100 mM de NaCl.



## INDICE DE CONTENIDO

	PÁGINA
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
Objetivo general	2
Objetivos específicos	3
Hipótesis	3
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
2.1 Compuestos de señalización	4
2.2 Ácido salicílico	6
2.3 Concentración del ácido salicílico en el tejido vegetal	7
2.4 Residualidad del ácido salicílico en tejido vegetal	10
2.5 Moléculas inducidas por ácido salicílico exógeno en el tejido vegetal	12
2.6 Inducción de antioxidantes por ácido salicílico exógeno	17
2.7 Actividad enzimática de la catalasa	20
<b>III. ARTÍCULO No.1: FOLIAR ACCUMULATION OF SALICYLIC ACID IN TOMATO (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) AFTER EXOGENOUS APPLICATIONS OF THE COMPOUND</b>	<b>28</b>
<b>IV. ARTÍCULO No. 2: RESIDUALIDAD DEL ACIDO SALICÍLICO Y SU EFECTO EN LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL EN TOMATE (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)</b>	<b>38</b>
<b>V. CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>63</b>
<b>V. LITERATURA CITADA</b>	<b>64</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Artículo No. 1</b>		<b>PAGINA</b>
<b>Figure 1.</b>	Concentration dynamics of SA in tomato ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) leaves in response to its exogenous application at $10^{-4}$ M ( $0.013 \text{ g L}^{-1}$ )	<b>32</b>
<b>Figure 2.</b>	Growth of stem, leaves, and roots of tomato ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) plants in response to foliar spraying with SA $1 \times 10^{-4}$ M ( $0.0138 \text{ g L}^{-1}$ )	<b>33</b>
 <b>Artículo No. 2</b>		
<b>Figura 1.</b>	Dinámica de la concentración de ácido salicílico en hojas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) como respuesta a la aplicación exógena del mismo a $10^{-4}$ M ( $0.013 \text{ g L}^{-1}$ ) cada 15 días bajo dos condiciones de desarrollo (0 y 100 mM de NaCl en el medio de cultivo)	<b>47</b>
<b>Figura 2.</b>	Dinámica de la actividad enzimática de la catalasa en hojas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) como respuesta a la aplicación exógena de ácido salicílico a $10^{-4}$ M ( $0.013 \text{ g L}^{-1}$ ) cada 15 días bajo dos condiciones de desarrollo (0 y 100 mM de NaCl en el medio de cultivo)	<b>50</b>
<b>Figura 3.</b>	Dinámica de la concentración de la capacidad antioxidante totales en hojas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) como respuesta a la aplicación exógena de ácido salicílico a $10^{-4}$ M ( $0.013 \text{ g L}^{-1}$ ) cada 15 días bajo dos condiciones de desarrollo (0 y 100 mM de NaCl en el medio de cultivo)	<b>51</b>
<b>Figura 4.</b>	Peso de los frutos ( $\text{g planta}^{-1}$ ) cosechados del día 73 al 105 después del trasplante en plantas de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) sometidas a los diferentes tratamientos de aplicación exógena de AS a $10^{-4}$ M ( $0.0138 \text{ g L}^{-1}$ ) y NaCl	<b>52</b>

## I. INTRODUCCION

Dentro de las plantas, las hormonas tienen un papel muy importante modificando el crecimiento y desarrollo al inducir un despliegue de procesos celulares, fisiológicos y morfológicos (Ashraf *et al.*, 2010), en años recientes algunos grupos de hormonas han sido identificadas, tal es el caso de los salicilatos, a los cuales también se les ha llamado compuestos de señalización (o elicitores), ya que no solo están envueltos en el crecimiento y desarrollo de la planta, si no también actúan como mediadores de las respuestas de las plantas al ambiente (Khan *et al.*, 2010; Purcareea y Cachita-Cosma, 2010). El grupo de los salicilatos, incluye el ácido salicílico (AS), el cual se encuentra de forma natural en las plantas desempeñando papeles importantes en cuanto a crecimiento (Noreen *et al.*, 2009; Purcareea y Cachita-Cosma, 2010), además de participar como parte de las señales internas que regulan la respuesta de la defensa de las plantas contra condiciones bióticas (Girling *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009), y abióticas (Ashraf *et al.*, 2010; Hussain *et al.*, 2011a). Se ha determinado que al aplicar el AS de forma exógena, este, induce tolerancia al estrés, mejorando la respuesta biológica de la planta frente a factores adversos de crecimiento (Noreen y Ashraf, 2008; Poor *et al.*, 2010), estimulando cambios en las concentraciones de una gran cantidad de compuestos de la planta (Kaidan *et al.*, 2006; Fatma, 2007; Hussain *et al.*, 2007; Karlidag *et al.*, 2009; Azooz y Yousef, 2010), dentro de los cuales se puede mencionar a los antioxidantes o capacidad antioxidante total (ANT) (Azooz, 2009; Khalili *et al.*, 2010) que son una vía de defensa de las plantas a los compuestos dañinos formados durante una condición adversa (Urbani *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2010), siendo de gran importancia los antioxidantes enzimáticos, dentro de los que se encuentra la catalasa (CAT), quien se encarga de la degradación del peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno, evitando con ello la formación de

radicales libres (Bettaieb *et al.*, 2007; Mahdavian *et al.*, 2007; Ortega-Ortiz *et al.*, 2007; Barba-Espin *et al.*, 2011).

La utilización del ácido salicílico en la práctica agrícola parece tener potencial desde el punto de vista comercial, considerando los resultados positivos encontrados en diferentes ensayos (Khodary, 2004; Gemes *et al.*, 2008; Noreen y Ashraf, 2008; Azooz, 2009; Jabbarzadeh *et al.*, 2009; Najafian *et al.*, 2009; Noreen y Ashraf, 2009; El-Khallal *et al.*, 2009; Villanueva *et al.*, 2009; Azooz y Youssef, 2010) y es cada vez más claro que el uso de compuestos de este tipo se torna una necesidad considerando que los estándares actuales de producción exigen la disminución del uso de pesticidas (Ozeretskovskaya y Vasyukova, 2001; Edreva, 2004; Esmailzadeth *et al.*, 2008). En ese sentido, la literatura científica y los trabajos técnicos realizados para el registro legal de productos cuyos ingredientes activos contienen elicidores como el salicílico han reportado incrementos o decrementos de concentraciones de sustancias antioxidantes (como catalasa) en el tejido vegetal a un determinado tiempo de realizada la aplicación exógena y han dejado de lado presentar el tiempo de residencia de esta hormona en los tejidos vegetales y/o su efecto inductor residual en la generación de moléculas antioxidantes, lo que sería de importancia para determinar el tiempo óptimo entre aplicación y aplicación (Larque-Saavedra *et al.*, 2010) para hacer más efectiva la aplicación de este material, que se sabe auxilia a las plantas bajo condiciones de estrés. De lo anterior se desprende la presente propuesta de investigación que tiene por objetivos:

### **Objetivo general**

Determinar la residualidad del ácido salicílico en hojas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) en invernadero después de la aplicación exógena del compuesto y su efecto sobre la formación de moléculas relacionadas con la tolerancia al estrés.

### **Objetivos específicos**

- Determinar la residualidad del ácido salicílico en hojas de plántulas y plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en invernadero después de la aplicación exógena.
- Determinar la relación entre el cambio en la concentración del AS en el tejido foliar y la actividad catalasa y la capacidad antioxidante total del tejido foliar de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo dos condiciones de salinidad (0 y 100 mM de NaCl).

### **Hipótesis**

La residualidad del AS en el tejido foliar de tomate tiene influencia directa sobre la presencia de las moléculas antioxidantes: catalasa (CAT) y capacidad antioxidante total (ANT).

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Compuestos de Señalización

Además de las hormonas vegetales conocidas comúnmente (citocininas, auxinas, giberelinas, ácido abscísico y etileno), otros compuestos reguladores del crecimiento han sido identificadas en las dos últimas décadas, tal es el caso de los brasinoesteroides, el óxido nítrico, poliaminas, triacontanol, ácido ascórbico, tocoferol, los salicilatos y los jasmonatos, a los cuales también se les ha llamado compuestos de señalización, elicitores o inductores de resistencia, ya que no solo están envueltos en el crecimiento y desarrollo de la planta, si no también actúan como medidores de las respuestas de las plantas al medio ambiente (Bishop y Koncz, 2002; Kim *et al.*, 2008; Hussain *et al.*, 2011b).

Los elicitores son sustancias que inducen protección o inducen respuestas de adaptación ante el estrés en las plantas, llamados inductores cuando se inició su investigación, siendo reconocidos por su inducción en la formación de fitoalexinas (Ozeretskoykaya y Vasyukova, 2001; Radman *et al.*, 2004), sin embargo hoy día se reconoce como elícitor a cualquier compuesto que estimule algún tipo de defensa en las plantas (Angelova *et al.*, 2006) basando su efectividad principalmente en la activación e incremento de metabolitos secundarios de las plantas (Zhao *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2011).

En base a su naturaleza los elicitores, pueden ser divididos o clasificados como bióticos y abióticos:

**Los elicitores bióticos**, son aquellos que tienen un origen biológico, pudiendo ser derivados de los patógenos (llamados también elicitores exógenos) o de las plantas cuando estas son atacadas por algún patógeno (llamados elicitores endógenos) (Angelova *et al.*, 2006). Dentro de los elicitores bióticos se encuentran compuestos como: polisacáridos (pectinas o celulosas

de las paredes celulares de las plantas, así como quitina, alginato y glucanos de los microorganismos), oligosacáridos (galacturonidos), péptidos (glutación), glicoproteínas, lípidos (lipoproteínas y lipopolisacaridos), ácidos orgánicos de bajo peso molecular (ácido salicílico), compuestos fitoquímicos de bajo peso molecular producidos por las plantas con 6 a 10 C en su conformación (como respuesta a daños físicos, así como ataques de roedores, insectos, herbívoros, hongos, virus y bacterias) y proteinkininasas.

**Los elicitores abióticos.** Son aquellos que no tienen origen biológico y son divididos en factores físicos (heridas mecánicas, radiación UV, alta salinidad, alta o baja osmolaridad, temperaturas extremas, aire con partículas pequeñas, sequía, ozono o alta presión) y compuestos químicos, los cuales a su vez son subclasificados como: compuestos químicos simples (sales inorgánicas, metales pesados, algunos químicos que alteran la integridad de la membrana), compuestos químicos contaminantes (metales pesados, pesticidas y aerosoles) y falta de estos compuestos químicos, es decir falta de nutrientes (Endreva, 2004; Angelova, *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2011).

Los elicitores son capaces de inducir diferentes modos de defensa de las plantas, incluyendo la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), la respuesta hipersensible y la formación de fitoalexinas (Montesano *et al.*, 2003; Endreva, 2004).

La cantidad de información acumulada hoy en día (por medio de diversos tipos de análisis, como: secuencia de genes, expresión de genes-trascricpción, diseño de proteínas, perfiles de metabolitos y compuestos lípidos) ha llevado a encontrar nuevas señales de cómo las plantas responden al estrés biótico y abiótico, en base a un programa de desarrollo y crecimiento en el ciclo de vida de la planta (formación de nuevos compuestos que estimulan cambios en las plantas para inhibir oxidación, estimular otros compuestos útiles en las plantas, etc.), el cual es enlazado y estimulado por las hormonas, dentro de las cuales se ha puesto mucho interés al grupo de los salicilatos (Ashraf *et al.*, 2010; Ogawa, *et al.*, 2010; Purcarea y Cachita-Cosma, 2010).

## 2.2. Ácido salicílico

El ácido salicílico (SA) se encuentra en las plantas de forma natural y juega papeles importantes en cuanto a crecimiento y procesos relacionados a la fotosíntesis al mejorar la actividad de los cloroplastos, absorción y transporte de nutrientes, incrementar la actividad de enzimas antioxidantes, provocar cambios en la anatomía de las plantas e incrementar el rendimiento (Chandra *et al.*, 2007; Noreen *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2010; Purcareea y Cachita-Cosma, 2010), además de lo citado, se considera de gran importancia, ya que está envuelto en señales internas que regulan la respuesta de la defensa de las plantas contra condiciones bióticas haciendo referencia a plagas y enfermedades, al estimular la formación de sustancias que repelen a los herbívoros, atraen a sus enemigos naturales, estimulan la formación de sustancias que inhiben o provocan la muerte de las células dañadas o dañinas, presenta influencia directa entre  $H_2O_2$  y glutatión (GSH) para generar homeostasis redox dentro de la célula (Mateo *et al.*, 2006; Girling *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009), y abióticas como temperatura, sales, exceso o falta de humedad, etc., al incrementar los niveles de enzimas antioxidantes, elevar el nivel endógeno de hormonas, inducir la aparición de proteínas de defensa, entre otras acciones (Kodary, 2004; Wang y Li, 2005; He y Zhu, 2008; Yusuf *et al.*, 2008; Yildirim *et al.*, 2008; Azooz, 2009; Noreen *et al.*, 2009; Najafian *et al.*, 2009; Karlidag *et al.*, 2009; Azooz y Youseef, 2010; Asharaf *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010), alterando en primera instancia la composición bioquímica de la célula seguida de cambios genéticos (Mustafa *et al.*, 2009).

El ácido salicílico (ácido orto-hidroxibenzoico), es un compuesto fenólico, se identificó por primera vez en la corteza del sauce (*Salix* sp) y fue aislado del metabolismo de la salicina (glucósido amargo) donde se le denominó salicyl alcohol glucósido para posteriormente llamarle ácido salicílico (Hayat y Ahmad, 2007), el compuesto original (salicina) mediante hidrólisis libera glucosa y alcohol salicílico que puede ser convertido en ácido salicílico o salicilato (que junto con el ácido acetilsalicílico y el metil salicilato conforman el grupo



denominado salicilatos). El ácido salicílico en forma libre, es un polvo cristalino que se funde entre 157 y 159 °C, es moderadamente soluble en agua, pero soluble en solventes orgánicos, el pH de la solución acuosa es de 2.4 tienen un peso molecular de 138.12 g M<sup>-1</sup>, una fórmula molecular C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>, un número CAS 67-72-7 (Sigma-Aldrich).

Se tienen dos posibles caminos de donde deriva el ácido salicílico iniciando con el ácido shikímico, seguido de la fenilalanina para llegar al ácido cinnámico: el primero de ellos es vía la de la siguiente descarboxilación de ácido cinnámico para generar ácido benzoico, el cual al experimentar hidroxilación resulta en ácido salicílico (Yalpani *et al.*, 1993; Métrauz, 2002) y una segunda ruta donde el componente derivado de la fenilalanina antes del ácido salicílico aún no es caracterizado. A las anteriores se suma la ruta vía biosíntesis de Corismato (Métrauz, 2002).

### **2.3. Concentración del ácido salicílico en tejido vegetal**

El ácido salicílico (AS) se encuentra en todos los órganos de las plantas en forma libre o en forma conjugada (glucósidos y ésteres, amidas, ácidos dihidroxibenzoicos, siendo las formas activas el éster metil salicilato y el mismo AS), a excepción de algunas plantas como el arroz (*Oryza sativa* L.) y la papa (*Solanum tuberosum* L.) que generalmente presentan la mayor parte del AS endógeno en forma conjugada (Wildermuth, 2006). Se ha identificado que cuando se requiere de AS, una parte de ello proviene de las reservas de formas conjugadas (Wildermuth *et al.*, 2001) mientras que otra parte proviene de la formación de este, gracias a la actividad de la enzima fenilalanina aminoliasa y la isocorismato sintetasa (Panina *et al.*, 2004; Holuigue *et al.*, 2007). La cantidad de AS se incrementa en el tejido vegetal como respuesta a factores adversos o cambios en el desarrollo de las plantas, inmediatamente después de que dicho factor es percibido, seguido de un incremento o decremento en los conjugados, por lo que las lecturas realizadas de AS presentan un comportamiento dinámico entre los conjugados y el ácido salicílico libre, que la

planta fórmula para su auxilio o reserva dependiendo de la necesidad de estas (Enyedi *et al.*, 1992; He *et al.*, 2007; Ogawa *et al.*, 2010).

Bajo diferentes condiciones de estudio se han reportado valores de AS en tejido vegetal tan bajos cercanos a  $13 \text{ ng g}^{-1}$  de peso fresco (PF) (Raskin *et al.*, 1990), hasta valores tan altos como los reportados por Ogawa *et al.* (2010) en *Arabidopsis* como respuesta a un estímulo físico alcanzando valores de 5 mM ( $660 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  de PF, valor que sumado a sus conjugados alcanzaba los 12 mM, es decir  $1600 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  de PF). Estos rangos en las concentraciones de AS en el tejido vegetal se pueden ver modificados dependiendo las condiciones de estudio, siendo las más comunes:

**Cultivar manejado.** Dentro de una misma especie manejada, los cultivares pueden contener diferentes cantidades de AS endógeno, Iqbal y Ashraf (2006) en semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.) bajo tratamiento “priming” con benciladenina (BAP) encontraron valores de AS de  $2.6 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  de PF en el cv. MH-97 en comparación con  $1.8 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  de PF en el cultivar Inqbal-91, así mismo cuando el tratamiento “priming” fue con Kinetina los valores de AS endógeno variaron más, teniendo 3.6 y  $1.3 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  de PF para los cv. MH-97 y Inqbal-91 respectivamente, (presentando los testigos 2.3 y  $1.1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  de PF para los cv. MH-97 y Inqbal-91 respectivamente).

**Etapa fenológica.** Dependiendo la etapa fenológica Abreu y Munne-Bosch (2009) en plantas de *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones controladas de luz encontraron cambios en la concentración de AS endógeno, siendo de  $1.5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  de PF durante la germinación,  $0.7\text{-}0.9 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  de PF durante el desarrollo vegetativo y alcanzando valores máximos de  $2.4 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  durante la floración.

**Factores bióticos y abióticos.** El ácido salicílico ha sido estudiado en su gran mayoría como inductor de resistencia a factores adversos (bióticos y abióticos), donde la concentración de este en el tejido vegetal siempre es modificada con respecto a un testigo sin factor adverso. Diversos trabajos han cuantificado el AS en tejido vegetal utilizando factores bióticos tales como: virus (MVT) que en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) han presentado valores máximos de AS de  $0.35 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  de PF (Yalpani *et al.*, 1991; Park *et al.*, 2007)

hasta  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  de PF (Shulaev *et al.*, 1995), ácaros (*Tetranychus urticae* Koch) sobre hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) donde se encontraron valores nueve veces mayores que el testigo (sin ácaros) alcanzando los  $12 \mu\text{g g}^{-1}$  de PF a las 24 h de provocado el estímulo (He *et al.*, 2007), insectos como el gusano bellotero (*Helicoverpa armígera* Hubner) sobre plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) presentando valores de hasta  $0.68 \mu\text{M g}^{-1}$  ( $91.12 \mu\text{g g}^{-1}$  de PF) seis veces mayores en comparación con el testigo sin daño (Peng *et al.*, 2004). De igual forma se ha reportado la concentración de AS endógeno como respuesta a algunos factores abióticos: altas temperaturas en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) encontrado hasta  $3 \mu\text{g g}^{-1}$  de PF a las 60 h después del tratamiento (Malamy *et al.*, 1992), condiciones salinas en plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) encontrando hasta  $65 \mu\text{g g}^{-1}$  de PF mientras que el testigo presento  $30 \mu\text{g g}^{-1}$  de PF a las 24 h (Hiroko *et al.*, 2010), entre otros.

**Aplicaciones de AS.** Las aplicaciones de AS de forma foliar o al sustrato también reportan modificaciones a la concentración del AS endógeno bajo algún factor de estrés: Enyedi *et al.* (1992) encontraron que las células infectadas con virus del mosaico del tabaco (VMT) alcanzaban valores de 3.5 a  $6.0 \mu\text{g g}^{-1}$  de PF después de 144 h de aplicar el AS (25 y  $100 \mu\text{M}$ ) en el medio de cultivo (mientras el testigo infectado contenía  $2.0 \mu\text{g g}^{-1}$  de PF), Esmailzadeth *et al.* (2008) al aplicar AS ( $400 \mu\text{M}$ ) sobre plantas de tomate con problemas de *Alteranria alternata* encontró resultados positivos e incremento el AS endógeno hasta valores de  $10.4 \mu\text{g g}^{-1}$  de PF (mientras que las plantas sin la aplicación presentaron  $3.2 \mu\text{g g}^{-1}$  de PF), Barbaus-Larson y Jacobsen (2007) e Iwai *et al.* (2007) al aplicar de probenazole (50 ppm) en remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) y arroz (*Oryza sativa* L.) respectivamente determinaron concentraciones de AS próximas a 3.1 y  $7.3 \mu\text{g g}^{-1}$  de PF respectivamente. Así mismo la dosis aplicada de AS puede influir sobre el contenido de este sobre el tejido vegetal, tal y como lo corroboró Norman *et al.* (2004) quienes en cultivo de células de tabaco encontraron mayor concentración de AS donde se aplicó 1 mM, seguido de 0.1 mM y por ultimo 0.01 mM y el control, teniendo valores de 4.0 a  $0.0 \mu\text{g g}^{-1}$  de PF para la dosis más alta y baja respectivamente a los 30

min después de aplicar y encontrando únicamente  $0.96 \mu\text{g g}^{-1}$  de PF para la concentración de AS más alta a las 24 h, de igual forma Kim *et al.* (2009) al aplicar AS sobre diente de león (*Taraxacum officinale* Wigg) encontraron que la cantidad endógena de AS a los 7 días después de la aplicación fue de 150 y  $175 \text{ ng g}^{-1}$  de PF para las dosis de 0.5 y 1.0 mM de AS respectivamente.

Es claro que los valores de concentración endógena de AS dependerán del tipo de ensayo aplicado y las condiciones bajo las cuales se lleve a cabo, manteniéndose como constante la derivación de una parte del AS libre hacia formas conjugadas, incluso si esta respuesta se encuentra acompañada de concentraciones muy altas de AS y tiempos de respuesta tan cortos como 30 minutos (Norman *et al.*, 2004; Chandra *et al.*, 2007).

#### **2.4. Residualidad del ácido salicílico en tejido vegetal**

No se conocen estudios encaminados a determinar la residualidad del AS cuando este es aplicado de forma foliar para determinar el número posible de aplicaciones necesarias para mantener los efectos positivos ante condiciones adversas durante un ciclo entero de desarrollo (Larque-Saavedra *et al.*, 2010), sin embargo Abreu y Munne-Bosch (2009) determinaron la concentración de AS presente en plantas de *Arabidopsis thaliana* (bajo condiciones de luz controlada) cada 5 días a partir de su germinación y hasta la floración determinando los valores mas bajos en el desarrollo vegetativo (5 y 10 días después de la germinación) y los más elevados durante la floración (20 días después de la germinación), así mismo existen reportes donde se ha determinado el comportamiento del AS a corto plazo después de aplicar el compuesto o inducir un estrés.

La residualidad o acumulación del AS en el tejido vegetal se presenta después de la inducción, en tiempos que pueden ir de minutos hasta horas después de esta, como se menciona a continuación:

**Incrementos de AS foliar en minutos.** Incrementos en la concentración de AS en el tejido foliar en minutos han sido reportados por: Enyedi *et al.* (1992)

quienes reportan que al aplicar AS (72  $\mu\text{M}$ ) sobre hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) desprendidas de la planta, la concentración máxima alcanzada (1.5  $\mu\text{g g}^{-1}$  de PF) se presentó a las 3 h después de la aplicación para caer a las 10 h y mantenerse en un valor estable (0.25  $\mu\text{g g}^{-1}$  de PF) durante las próximas horas de evaluación (50 h), lo que indica una degradación acelerada del AS en tejido vegetal sin vida, lo que es similar en cultivos de células, como lo demostraron Norman *et al.* (2004) quienes aplicaron AS (de 0.01 a 1.0 mM) sobre cultivo de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) determinando que el valor máximo en todas las dosis se presentó a las 0.5 h después de la aplicación para encontrar valores nulos a las 24 h. Sin embargo Peng *et al.* (2004) encontraron el pico de máxima acumulación de AS a las 0.5 h después de iniciar el daño con gusano bellotero (*Helicoverpa armígera* Hubner) sobre plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) seguido de una caída que igualó al testigo para volver a elevarse (dentro de las 24 h de evaluación después del inicio del daño) justificando este comportamiento a la fuerte y directa señalización del AS como respuesta a la alimentación del gusano.

**Incremento de AS foliar a las 24 hrs.** Factores abióticos como daño mecánico sobre *Arabidopsis thaliana* incrementan la concentración de AS en el tejido foliar de forma significativa a las 24 h para posteriormente presentar caídas sin alcanzar su valor inicial a las 48 h después de la herida (Ogawa *et al.*, 2010), valores de tiempo similares se han reportado con la aplicación de materiales inductores de tolerancia como el Inabenfide (Hiroko *et al.*, 2010), sin embargo opuesto a esto Barbagus-Larson y Jacobensen (2007) reportan que no hubo incremento en la concentración de ácido salicílico en remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) tras la aplicación de diferentes elicitores (Azibensolar-S-metil, *Bacillus micoides* y Probenazole) durante 48 h de evaluación. Factores bióticos como la inoculación de virus (MVT) incrementan en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) la concentración de AS foliar pasadas 24 h y alcanzar los valores máximos a las 56 h (Malany *et al.*, 1992) ó 96 h después de la inoculación (Park *et al.*, 2007), o el estímulo por el acaro (*Tetranychus urticae* Koch) sobre hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) que presenta incrementos en

la concentración de AS a las 72 h después de la inoculación con el ácaro, para continuar su incremento sin presentar caída durante todo el periodo de evaluación e infestación (20 días) (He *et al.*, 2007).

## **2.5. Moléculas inducidas por el ácido salicílico exógeno en el tejido vegetal**

El ácido salicílico (AS) cuando es aplicado de forma exógena genera cambios en las concentraciones de los compuestos celulares que conducen a una adaptación de la planta ante un factor adverso (biótico o abiótico), mejor desarrollo de planta y rendimiento (Benavides-Mendoza *et al.*, 2004; Chandra *et al.*, 2007; Jabbarzadeh *et al.*, 2009; Mady, 2009; Yildirim y Dursum, 2009; Gharib, 2010; Khan *et al.*, 2010; Purcarea y Cachita-Cosma, 2010).

Existe gran cantidad de reportes donde se han determinado los cambios en las concentraciones de moléculas o compuestos internos, así como procesos y funciones de las plantas como respuesta a la aplicación de AS en diversas formas, dosis y cultivos (Ahsraf *et al.*, 2010), algunas de las condiciones más comunes de trabajo son:

**Aplicaciones foliares de AS bajo condiciones de estrés.** Buscando incrementar compuestos internos en las células vegetales que permitan la adaptación de las plantas a una condición adversa se han manejado aplicaciones foliares de AS cuyos valores van de 0.0001 a 10 mM en diferentes cultivos. En plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) He y Zhu (2008) reportan mayor actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutacion peroxidasa (GPX), contenido de ascorbato y glutatión, así mismo disminución en la peroxidación de lípidos al aplicar AS (1 mM) en comparación con las plantas estresadas con NaCl (100 mM), Ahmend (2009) encontró incrementos en la absorción de K, Ca y Mg así como reducción en la absorción de Na y Cl al aplicar AS (0.01 mM) en comparación con el testigo salino (100 mM de NaCl), Shahba *et al.* (2010) reportan incrementos en los pigmentos fotosintéticos al aplicar AS (1.5 mM) lo que resultó superior en

comparación con el testigo bajo estrés salino (50 mM de NaCl), el mismo Shahba *et al.* (2010b) reportan incremento sobre la cantidad de carbohidratos y reducción en la cantidad de prolina al aplicar AS (1.5 mM) en comparación con el testigo estresado (100 mM de NaCl), Poor *et al.* (2010) reportan mayor índice de fijación de CO<sub>2</sub>, densidad de flujo fotosintético, y actividad de la RuBisCO al aplicar AS a 10<sup>-4</sup> M (0.1 mM) y 10<sup>-7</sup> M (0.0001 mM) en comparación con el testigo estresado con NaCl (100 y 150 mM), Umebese *et al.* (2009) reportan incremento en la actividad de la nitrato reductasa al aplicar AS (3 mM) en plantas bajo estrés por deficiencia de agua, lo que permitió mantener el desarrollo vegetativo en comparación con el testigo estresado. En plantas de maíz (*Zea mays* L.) Khodary (2004) encontró incrementos en la actividad de la RuBisCO, clorofilas, carotenoides, carbohidratos solubles y polisacáridos cuando aplicó AS a 10<sup>-2</sup> M (10 mM) en condiciones de salinidad (50, 100 y 150 mM de NaCl), así mismo Gunes *et al.* (2007) reportan incremento en las sustancias captadores de luz UV y en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, N, Mg, Fe, Mn y Cu al aplicar AS (0.1, 0.5 y 1.0 mM) ante una condición salina (40 mM de NaCl), de igual forma Tuna *et al.* (2007) encontraron incrementos en la actividad enzimática de la peroxidasa (POD) y disminución de la SOD y polifenol oxidasa y mayor absorción de nutrientes en general cuando aplicó AS (2 mM) bajo condiciones salinas (125 mM). En plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.) Noreen y Ahsraf (2008) encontraron incremento del índice fotosintético al aplicar AS a 100 mg L<sup>-1</sup> (0.75 mM) en comparación con el testigo salino (120 mM), de igual manera Noreen y Ahsraf (2009) encontraron mayor actividad de SOD y POD al aplicar AS a 100, 200 y 300 mg L<sup>-1</sup> (0.75, 1.5 y 2.24 mM) en plantas de chicharo (*Pisum sativum* L.) bajo condiciones salinas (120 mM de NaCl). En plantas de trigo (*Triticum aestivum* cv. Hassawi) Azooof y Youssef (2010) reportan incrementos en el contenido de proteínas y carbohidratos solubles al aplicar AS a 50 mg L<sup>-1</sup> (0.4 mM) en plantas bajo condiciones de estrés por sequía (30% humedad), y Erdal *et al.* (2011) reporta incremento en la actividad de SOD y CAT y reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las hojas al aplicar AS (0.5 mM) un día antes del factor de estrés (80 y 100 mM de NaCl). Otros cultivos

menos citados donde se ha verificado el cambio en la composición de los contenidos celulares: Najafian *et al.* (2009) en tomillo (*Thymus vulgaris* L.) bajo condiciones salinas (50-150 mM de NaCl) encontraron decremento en la conductancia estomática y el índice de transpiración al aplicar AS a 150 y 300 mg L<sup>-1</sup> (1.1 y 2.2 mM), Wang y Li (2005) en uva de mesa (*Vitis vinífera* L. cv. Jingxiu) con otro factor de estrés como el calor y el frío determinaron que al aplicar (previo al estrés) AS a 100 µM (0.1 mM) las actividades de la ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa, monohidroascorbato y el índice redox de la fuente glutatión (GSH) permanecían en niveles altos en comparación con los testigos estresados, lo que permitía una mayor adaptación a este factor de estrés, posteriormente Wang *et al.* (2010) en el mismo cultivo (*Vitis vinífera* L. cv. Jingxiu) estresado con calor y donde se aplicó AS a 100 µM (0.1 mM) encontró mayor recuperación de las plantas (en la actividad de la RuBisCO y la actividad del PSII) cuando el factor de estrés fue retirado, Hussain *et al.* (2011) en violetas (*Viola odorata* L.) bajo condiciones salinas (100 mM de NaCl) encontró reducción en la absorción de Na y Cl al aplicar AS a 30 mg L<sup>-1</sup> (0.22 mM) lo que permitió superar la condición adversa en comparación con el testigo salino.

#### **Aplicaciones foliares de AS sobre plantas sin estrés manifiesto.**

Aplicaciones realizadas de AS sobre plantas sin estrés manifiesto han denotado cambios en los componentes de las células vegetales, El-Shraiy y Hegazi (2009) en chícharo (*Pisum sativum* L.) encontraron incrementos en las concentraciones de clorofila, proteína soluble, fenoles, carbohidratos totales, sacarosa al aplicarle AS de 10-20 mg L<sup>-1</sup> (0.075 y 0.15 mM), Chandra *et al.* (2007) en caupi o judías (*Vigna unguiculata* L. Walp) encontró incremento en proteínas, azúcares solubles, actividad de la peroxidasa y clorofila al asperjar AS a 0.02 % (2.5 mM) variando el efecto de acuerdo al cultivar manejado, Gharib (2010) en albahaca dulce (*Ocimum basilicum* L.) y orégano (*Marjorana hortensis* L.) encontró incremento en carbohidratos totales, proteína cruda, aminoácidos totales, prolina, clorofila, microelementos y aceites esenciales al asperjar AS (0.01 y 0.1 mM), Kim *et al.* (2009) en diente de león (*Taraxacum*



*officinale* Wigg) encontraron modificación en la cantidad de flavonoides y giberelinas (incrementó AG9 y AG4, y redujó AG20 y AG1) al asperjar AS (0.5 y 1.0 mM), Villanueva-Coch *et al.* (2009) en crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Kitamura) reporta incrementos en N, P y K después de aplicar AS a  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-10}$  M (0.001, 0.00001 y 0.0000001 mM), Khokon *et al.* (2010) en *Arabidopsis thaliana* determinaron mayor cierre estomático (de forma independiente al incremento de Ca, incremento de especies reactivas de oxígeno en las células guarda e inactivación de los canales de K), Yildirim y Dursun (2009) en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) detectaron mayor incremento en la cantidad de clorofila al aplicar AS de 0.25 a 1.0 mM.

**Aplicaciones de AS sobre semillas (“priming”).** Ensayos donde se ha manejado tratamiento “priming” con AS, para posteriormente hacer germinar y crecer las plantas sobre condiciones adversas han reportado cambios en las concentraciones internas de los compuestos de las células lo que ha permitido mejor desarrollo de las plantas. Deef (2007) en semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) imbibidas en solución de AS (0.05 mM) y posterior germinación bajo condiciones de salinidad (150 mM de NaCl) encontraron incrementos en los contenidos de prolina a los ocho días después de la germinación generando tolerancia al factor adverso, también en cebada (*Hordeum vulgare* L.) El-Tayeb (2005) aplicando AS (1 mM) a semillas y poniéndolas a germinar en condición salina (50, 100, 150 y 200 mM) encontró incrementos en el contenido de agua, pigmentos fotosintéticos, actividad de la peroxidasa, así como descenso en la concentración de proteínas solubles, Na, peroxidación de lípidos y fuga de electrolitos en comparación con el testigo salino, Sakhabutdinova *et al.* (2003) en semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.) imbibidas en AS a 0.05 mM de AS y someterlas a germinación en medio con 3% de NaCl reportó mejor respuesta al decremento de citocininas y AIA, Kaydan *et al.* (2007) también en semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.) al aplicar 0.001, 0.1 y 10 mM de AS y exponerlas a un medio a  $8 \text{ dS m}^{-1}$  reportan incremento en los contenidos de carotenoides y clorofila, Purcarea and Cachita-Cosma (2010) al impregnar semillas de maíz (*Zea mays* L.) con solución de AS

(0.05 mM) encontraron incrementos en la actividad enzimática de la POD para evitar pérdida de clorofila ante 150 mM de NaCl.

**Aplicaciones al medio de cultivo.** Se han realizado aplicaciones de AS al medio de cultivo, presentándose incrementos en compuestos internos de las plantas, Janda *et al.* (1999) en plántulas de maíz (*Zea mays* L.) al aplicar AS (0.5 mM) al medio de cultivo encontraron incrementos en la concentración de gliacol peroxidasa y glutatión peroxidasa lo que permitió una mejor adaptación en condiciones de bajas temperaturas, Tari *et al.* (2002) en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) encontraron menor pérdida de clorofila y carotenoides y se evitó la disminución del transporte de electrones al aplicar AS a  $10^{-4}$  y  $10^{-7}$  M (0.1 y 0.0001 mM) al medio hidropónico y condición salina (100 mM de NaCl) en comparación con el testigo sin aplicación, Waseem *et al.* (2006) en trigo (*Triticum aestivum* L.) al aplicar AS a 5 ppm (0.037 mM) en el medio de cultivo hidropónico de forma previa al estrés (sequía a -0.6 MPa) encontraron incremento en la conductancia estomática, en el índice de transpiración, así como incremento en absorción de N y P, provocando mejor recuperación de las plantas dependiendo el cultivar, Szepesi (2006) en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), al aplicar al medio de cultivo AS a  $10^{-4}$  y  $10^{-7}$  (0.1 y 0.0001 mM) previo a una condición salina (100 mM de NaCl), encontró mayor acumulación de osmolitos compatibles mejorando la eficiencia fotosintética, la actividad de la ascorbato peroxidasa, así como el contenido de carotenoides y poliaminas, de igual forma Szepesi *et al.* (2008) en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) al aplicar al medio de cultivo AS a  $10^{-4}$  y  $10^{-7}$  (0.1 y 0.0001 mM) durante tres semanas previo a una condición salina (100 mM de NaCl) que duro una semana, encontraron mayor actividad de SOD y CAT, así como un decremento en la concentración de  $H_2O_2$  (al evaluar una semana después del tratamiento salino), Gemes *et al.* (2008) también en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) al aplicar al medio de cultivo AS (0.1 mM) de forma previa a un factor de estrés como lo podría ser la salinidad (100 mM) reportan incremento de prolina, pigmentos fotosintéticos y carbohidratos solubles cuando dicho factor se presentó (ocho semanas después de la germinación) lo que

permitió mejor adaptación, así mismo Cag *et al.*, (2009) en cotiledones de girasol (*Helianthus annuum* L.) reportan incrementos de carotenoides, proteínas y actividad enzimática de la POD al aplicar AS (0.1, 1.0 y 10.0  $\mu$ M). Aplicaciones in vitro también han reportado efecto sobre las concentraciones de los contenidos de las células, Norman *et al.* (2004) en cultivo de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en solución, encontró mayor actividad de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria y actividad enzimática de la oxidasa alternativa (OAX) cuando aplicó AS (0.01 a 5.0 mM).

## **2.6 Inducción de antioxidantes por ácido salicílico exógeno**

Los antioxidantes son compuestos capaces de detener biológicamente a las especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas durante el estrés oxidativo sin llegar a experimentar una conversión a peligrosos radicales libres. Los ROS son generados en condiciones aerobias durante el metabolismo normal de la célula, pero altos niveles de esas moléculas pueden ocurrir durante el estrés oxidativo, donde su acumulación depende del balance en la formación de ellos y la formación de los compuestos que los controlan (Mittler *et al.*, 2004). Exposición de las plantas a alta irradiación, temperaturas extremas, inundaciones, ozono, dióxido de sulfuro, salinidad, sequía, patógenos, daños mecánicos, así como la duración de la exposición, la intensidad o grado de esta, han sido reportados como inductores de la formación de ROS. El estrés oxidativo puede ser uno de los efectos generados en diversos tipos de estrés (Noreen *et al.*, 2009). Como medida de defensa ha sido bien establecido que las plantas generan antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes enzimáticos comúnmente conocidos son: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peróxido dismutasa (POD), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión reductasa (GR), mientras que los antioxidantes no enzimáticos son: glutatión (GSH), ascorbato (AsA), carotenoides, fenoles, flavonoides, ácido ascórbico y tocoferol, entre otros (Gupta y Sharma, 2009).

Existen muchos trabajos donde se reporta el efecto de inductor del ácido salicílico sobre los antioxidantes de forma aislada, sin embargo, dado que existen diferentes tipos y clases de antioxidantes, es importante conocer la capacidad antioxidante total (ANT), la cual es la capacidad acumulada de los componentes que eliminan los radicales libres o ROS (Pellegrini *et al.*, 2003), para ello los antioxidantes totales se pueden medir mediante diferentes mecanismos químicos dentro de los que se encuentran la capacidad equivalente antioxidante de Trolox (TACE), parámetro antioxidantes de secuestro de radicales (TRAP), poder antioxidante reductor férrico (FRAP), entre otros. Efectos del ácido salicílico sobre la ANT han sido reportados por Kandaker *et al.* (2008) en amaranto (*Amaranthus tricolor* L.) al aplicar AS foliar a dosis de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  M (1.0, 0.1 y 0.01 mM) a los 7, 15 y 21 días después de la siembra, donde encontraron en todas las dosis un incremento en la ANT en comparación con el testigo absoluto, lo que junto con otros cambios analizados produjo un incremento en el rendimiento, Huang *et al.* (2008) en aplicaciones pre-cosecha de AS (1 y 2 mM) sobre naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) encontró incrementos en la ANT (junto con moléculas antioxidantes evaluadas de forma individual) al momento de consumo, encontrando correlación entre la ANT y los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos evaluados, Sayyari *et al.* (2011) encontraron incrementos en ANT en granadas (*Punica granatum* L.) aplicadas con ácido acetil salicílico (0.1, 0.5 y 1.0 mM) antes de refrigerar por periodos de 14 hasta 84 días para encontrar mayor resistencia al frío y componentes antioxidantes de forma individual en comparación con el control (así como la mejora de las componentes internas de la fruta), Valero *et al.* (2011) en cereza (*Prunus avium* L.), reportan que la aplicación de AS incrementa la ANT y no presenta caída en comparación con el control durante 20 días de almacenaje, Wei *et al.* (2011) en espárrago (*Asparagus officinalis* L.) al aplicar AS y almacenar durante seis días reportó una dinámica en la concentración de la ANT, tiempo durante el cual se alcanzó el valor máximo de la ANT, sin embargo Promyou *et al.* (2012) no encontraron efecto significativo en la ANT al sumergir los tallos de cinco cultivares de flores

de anturio (*Anthurium andraeanum* L.) en AS (1 y 2 mM) y exponerlos a condiciones de bajas temperaturas (4 y 12 °C), aunque si encontraron incremento en CAT y SOD atribuyendo a esto un retraso el colapso de las flores ante la temperatura baja, así mismo Razack y Tarpley (2011) en arroz (*Oryza sativa* L.) quienes no reportan cambio en los ANT al aplicar AS a 19 g ha<sup>-1</sup> (1 mM), sin embargo se presentaron incrementos en otros compuestos y funciones de la planta lo que arrojó un incremento en rendimiento del 13.5% enfocando esto al decremento en la respiración y el incremento en la integridad de la membrana. Las diferentes respuestas de la ANT en ante la aplicación de AS, se deben entre otras cosas a las especies, variedades y dosis manejadas tal como lo indica Ramírez *et al.* (2006) al aplicar AS a 10<sup>-6</sup> M (0.001 mM) en acelga (*Beta vulgaris* L.) donde la ANT se incrementó en 3.51% en comparación con el testigo, en coliflor y repollo (*Brassica oleracea* L.) a la misma dosis de AS encontró efecto nulo, y en brócoli (*Brassica oleracea italica*) efectos negativos al encontrar disminución de la ANT (14.3%) en comparación con el testigo absoluto (estando este cercano a los 2 mM de Trolox mg<sup>-1</sup> de peso fresco). Así mismo se presenta variación en el contenido de ANT en una misma especie ante diferentes tipo de estrés (Saleh y Plieth, 2009).

De igual forma determinar la ANT en los alimentos con fines de consumo, ha adquirido gran importancia (independientemente de su manejo agrícola) tal y como lo propuso Pellegrini *et al.* (2003) al examinar en el mercado italiano la ANT (por tres metodologías diferentes) de 34 vegetales, 30 frutos, 34 jugos o bebidas y 6 vegetales para aceite, encontrando los valores más bajos en el apio (0.41 mM de trolox mg<sup>-1</sup> PF) y los más altos en los espárragos (9.71 mM de trolox mg<sup>-1</sup> PF), estando los valores del tomate entre 1.3 a 1.7 mM de trolox mg<sup>-1</sup> PF para “saladet” y “bola” respectivamente. Esa variación tan grande puede ser explicada por las especies y variedades (Ramírez *et al.*, 2006), sin embargo Guan y Whiteman (2005) definen que las variaciones se deben en particular a la acumulación de Vitamina C y tocoferol (como los componentes de mayor volumen) así como los compuestos fenólicos, lo que definitivamente está definido por cuestiones genéticas y/o el medio ambiente (Ramírez *et al.*, 2006).

## 2.7 Actividad enzimática de la Catalasa

La típica reacción de la catalasa (EC 1.11.1.6) es la disminución de dos moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y  $\text{O}_2$ , función que realizan junto con las peroxididasas siendo indispensables para la detoxificación de ROS durante el estrés (Garg y Manchanda, 2009) generado por la fotorespiración, oxidación de ácidos grasos y el catabolismo de purinas (Gill y Tuteja, 2010). Aunque algunas catalasas de bacterias usan Mn como cofactor de la reacción redox, todos los eucariotas conocidos tienen como base el grupo hemo (es decir contienen Fe). Las catalasas están compuestas de polipéptidos que en suma tienen una masa de entre 50 a 70 kDa, estando conformados como tetrámeros, donde cada monómero contiene un grupo hemo (Zamocky *et al.*, 2008).

**Función de las catalasas.** La función básica de las catalasas es la degradación de la molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y  $\text{O}_2$ , lo cual ha sido demostrado mediante estudios de isótopos radioactivos, donde se ha establecido que el  $\text{O}_2$  generado mediante la reacción catalítica (dismutación) proviene de una sola molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kato *et al.*, 2004) y con el remanente de  $\text{H}_2$  y la otra molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se producen las dos moléculas de agua que son formadas en distintos pasos. Las catalasas y peroxididasas rompen las uniones de O-O para generar la primera molécula de agua con el acompañamiento de la producción de un oxi-ferril (Compuesto I) y un catión radical porfirino, así la especificidad de la catalasa conlleva a la oxidación de la segunda molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_2$  como el Compuesto I el cual es reducido para regresar al estado original, lo que implica la liberación del segundo  $\text{O}_2$  que se libera de forma conjunta con la molécula de agua (Alfonso-Prieto *et al.*, 2009). Mientras que el Compuesto I de la catalasa es rápidamente reducido por dos electrones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**Estrés y su efecto en la actividad de las catalasas.** Se ha reportado incremento en la actividad de la CAT por diversas condiciones de estrés: osmótico (Herrera-Santoyo *et al.*, 2007), bajas temperaturas (Jiang *et al.*, 2011), paraquat (Shahrtash *et al.*, 2011), salinidad (Bakarat, 2011; Khelifa *et al.*, 2011),

sequía (Mafakheri *et al.*, 2010), toxicidad por microelementos (Soto *et al.*, 2011), permitiendo la adaptación de las plantas a determinado factor, sin embargo cambios en el comportamiento de la actividad de CAT se presentan dependiendo de la intensidad del estrés, tal como lo determinaron Esfandiari *et al.* (2007) quienes en dos cultivares (saldari y alvand) de trigo (*Triticum aestivum* L.) bajo estrés salino, encontraron incremento en CAT a 50 mM de NaCl, sin embargo con 100, 150 y 200 mM de NaCl presentaron valores inferiores al testigo (0 mM de NaCl), destacando el incremento de otras enzima antioxidantes en el cv. Saldari lo que le permitió mejor adaptación a las condiciones salinas, John *et al.* (2007) en lenteja de agua (*Lemna polyrrhiza* L.) al someterla a estrés por toxicidad con Cd (1, 10, 20, 30 y 40 ppm) encontró que la CAT incrementó su actividad a 1 ppm de Cd pero se disminuyó en el resto de las concentraciones, Kachout *et al.* (2010) encontraron incrementos en la actividad de CAT cuando sometió a Bledos (*Atriplex hortensis* L., y *Atriplex rosea* L.) en sustratos con 25 y 50% de suelo contaminado por metales pesados (Cu, Ni, Pb y Zn), sin embargo la CAT disminuyó cuando el porcentaje de suelo contaminado subió a 75 y 100%, estas variaciones en el comportamiento de la CAT son explicadas por Amor *et al.* (2005) afirmando que la actividad protectora de los antioxidantes (incluyendo la CAT) tiene un límite específico, para llegar a ser rebasada por la generación de ROS. Sin embargo la defensa contra las moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, también está en función de la especie, tal y como lo determinaron Geun-Choi *et al.* (2004) quienes encontraron niveles elevados de CAT en soya (*Glicine max* L.) en comparación con los niveles de *Rehmannia glutinosa*, ocurriendo lo opuesto cuando determinó APX, donde los valores para soya fueron bajos y elevados para dihuang (*Rehmannia glutinosa* Gaertn), lo que indica que cada especie requiere diferentes sistemas regulatorios de los ROS (Mittler, 2002; Mafakheri *et al.*, 2010), incluso dentro de la misma especie, los diferentes cultivares pueden presentar diferente actividad enzimática de la CAT como lo determinaron Ashraf y Baghban (2010) en dos cultivares (A-180 y A-619) de plantas de maíz (*Zea mays* L.) donde la actividad del cv. A-180 presentó valores significativos con respecto al testigo sin estrés, siendo casi el

doble que los valores de CAT del cv. A-619, así mismo diferentes factores de estrés (calor, frío, sequía y salinidad) sobre una misma especie dan como resultado variación en el comportamiento de la actividad de la CAT y de las diferentes moléculas antioxidantes, como lo reportan Saleh y Plieth (2009) en mastuerzo (*Lepidium sativum* L.). Sabiendo lo anterior y bajo el conocimiento de que las catalasas tienen el más alto índice de conversión de  $H_2O_2$  en agua y  $O_2$  (pudiendo una molécula de CAT convertir 6 millones de moléculas de  $H_2O_2$  durante 1 min), mucha investigación ha llevado a integrar genes de catalasa de especies de alta actividad de la CAT a especies de baja actividad de la CAT, haciéndolas resistentes a factores adversos específicos (Sinkevich *et al.*, 2009; Motohashi *et al.*, 2010).

**Clasificación de las catalasas.** Las catalasas se pueden dividir en tres grupos, dos de los cuales para realizar su función contienen un grupo hemo: catalasas típicas (también llamadas monofuncionales) y catalasas-peroxidasas. Las catalasas típicas comprenden el grupo más abundante y se encuentran en eurobacterias, archaeobacterias, hongos, plantas y animales, mientras que las catalasas-peroxidasas no se encuentran en plantas ni animales. El tercer grupo se encuentra en una minoría de bacterias y tienen por características que trabajan con un Mn como sitio activo en lugar del grupo hemo, por lo que también se les llama catalasas-Mn (Mn-Cat). Aunque los tres grupos catalizan la misma reacción son diferentes significativamente en: arquitectura de su sitio activo, mecanismo de reacción y presencia en organismos vivos (Zamocky *et al.*, 2008). En base a su tamaño los grupos de catalasas que contienen grupo hemo son subdivididas en: largas (mayor de 75 kDa) o pequeñas (menor de 60 kDa) subunidades. En las catalasas típicas en las plantas superiores, mediante análisis filogenéticos, se ha demostrado la presencia de varios subgrupos dentro del grupo menor a 60 kDa, por lo que en la actualidad se consideran tres o más subtipos de catalasas, dependiendo de la especie de estudio (Zamocky *et al.*, 2008). En *Arabidopsis*, la secuencia de los genomas ha confirmado la presencia de tres genes de catalasas, dos localizados en el cromosoma 1 (CAT1 y CAT3) y uno localizado en el cromosoma 4 (CAT2) (Frugoli *et al.*,



1996), sin embargo se conocen cuatro en girasol (*Helianthus annuus* L.) (Azpilicueta *et al.*, 2007), tres en maíz (*Zea mays* L.), entre otros.

La nomenclatura de la catalasa suele causar confusión cuando se comparan estudios de diferentes especies de plantas, así Willekens *et al.* (1995) propusieron una clasificación basada en nombrar los genes de tabaco, de acuerdo con este agrupamiento, se proponen tres clases de catalasas. Las catalasas Clase I son fuertemente expresadas en tejido fotosintético, mientras de la Clase II están asociadas con tejidos vasculares, y la Clase III de catalasas son notablemente expresadas en semillas y tejidos reproductivos. Aunque las tres clases de catalasas pueden no corresponder de forma exacta entre especies. La evidencia disponible sugiere que los genes de *Arabidopsis* CAT1, CAT2 y CAT3 corresponden a las clases de catalasas III, I y II respectivamente. El gen CAT1 es principalmente expresado en polen y semillas, CAT2 en tejidos fotosintéticos, pero también en raíces y semillas, mientras que el CAT3 está asociado a tejido vascular, pero también en hojas. Los tres genes o sus transcritos (ARNm) pueden ser detectados en rosetas de *Arabidopsis*, aunque CAT3 y CAT2 son mucho más abundantes en comparación con CAT1 (Frugoli *et al.*, 1996). Así mismo se pueden encontrar dentro de la Clase I los genes Cat1 de tabaco, cat2 de calabaza, Cat2 de maíz y CatC de arroz, dentro de la Clase II los genes Cat2 de tabaco, cat3 de calabaza, Cat3 de maíz y CatA de arroz, y dentro de la Clase III los genes Cat3 de tabaco, cat1 de calabaza, Cat1 de maíz y CatB de arroz, haciendo referencia el termino cat (CAT, Cat, cat, kat, CATA, CTA) al gen de la catalasa y el numero o letra que le acompaña (1, 2, 3, etc. ó A, B, C, etc.) al orden de su descubrimiento. Las variaciones en la actividad de las diferentes catalasas son generalmente mucho menos evidentes que los cambios en los transcritos (Dutilleul *et al.*, 2003), pudiendo darse la expresión de cada una, en relación a un factor de estrés determinado sin existir presencia de las otras (Azpilicueta *et al.*, 2007)

**Ubicación de las catalasas.** Mittler *et al.* (2004) indica que las catalasas están localizadas de manera principal en los peroxisomas, sin embargo se han encontrado en otros compartimentos (Petrova *et al.*, 2004). Se conocen dos

mecanismos por los cuales las proteínas (catalasas) entran a los peroxisomas, el más común es la ruta de la secuencia de focalización peroxisomal 1 (PTS1) la que dependiendo del triplete de bases terminal (en el gen) define el comportamiento de entrada acorde a su receptor (proteína), la segunda ruta es similar cambiando de receptor (Kaur *et al.*, 2009). La presencia de actividad de catalasas en otros compartimentos subcelulares es menos establecida, siendo estos el citosol y las mitocondrias las más comúnmente descritas, ya que también han sido detectadas en cloroplastos, lo que puede ser atribuido a la presencia de peroxisomas en el cloroplasto o adhesión de enzimas contaminantes al exterior del cloroplasto (Kaur *et al.*, 2009). Significante actividad de la catalasa ha sido detectada en mitocondrias de maíz de primeras hojas (siendo la Cat3 la de mayor presencia), sin embargo permanece incierto si esta presencia se debe a un transporte inconcluso de las catalasas a los peroxisomas, ya que se conoce que algunas proteínas de peroxisomas pueden entrar a estos como oligómeros preformados o como monómeros siguiendo oligómeros desensamblados (Brown and Baker, 2008). Así la actividad de catalasas en el citosol podría posiblemente incrementarse debido al ensamble con tetrámeros que se encuentren esperando a ser importados.

**Acido salicílico exógeno y su relación con las catalasas.** Existen genes que pueden ser inducidos por factores de estrés ya sea bióticos y/o abióticos, mientras que hormonas (Olteanu *et al.*, 2009) y varios compuestos relacionados con el estrés, como ABA, AJ, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el mismo AS también pueden inducir esa expresión (Salzman *et al.*, 2005) actuando como señalizadores o inductores de resistencia que generan las respuestas adaptativas que ocurren frente a cualquier factor ambiental interactuando con receptores específicos ubicados normalmente en las membranas que rodean al citoplasma, al tonoplasto, así como a otros organelos siendo el receptor activado el que modifica la expresión génica, e induce la síntesis y acumulación de ciertos metabolitos secundarios, fitoalexinas proteínas u otros compuestos relacionados con las respuestas al estrés (Benavides-Mendoza, 2002).

Cuando se trata de aplicaciones exógenas de AS, se tiene evidencia de que en interacción con las especies reactivas del oxígeno (ROS) llevan la señal del control genético como respuesta a las reacciones de la célula ante un factor de estrés (Miller *et al.*, 2010). Los factores adversos, como la salinidad, disparan el estrés oxidativo en los tejidos de las plantas a través del incremento de ROS (Apel y Hirt, 2004), para eliminarlas, las plantas poseen mecanismos específicos (activados por genes o compuestos señalizadores) dentro de los cuales se incluye la activación de enzimas antioxidantes y antioxidantes no enzimáticos (Mittler, 2002; Gupta y Sharma, 2009). Esta idea se propuso cerca de 15 años atrás, centrando la discusión en si el AS promovía la biosíntesis de ROS o los ROS promovían la biosíntesis del AS, sin embargo hoy día se sabe que ambos procesos son llevados a cabo para estimular las respuestas de defensa. Se cree que la interacción de AS y ROS en las reacciones de defensa local es producida porque  $H_2O_2$  activa la biosíntesis de AS vía la ruta de fenilalanina y este a su vez estimula la síntesis de enzimas antioxidantes (Kawano, 2003).

Numerosos estudios en las últimas dos décadas han adaptado la estrategia de sobreexpresar las enzimas antioxidantes con el objetivo de incrementar la resistencia de las plantas a factores adversos, siendo el AS una hormona que tiene función protectora y que incluye la regulación de los ROS y enzimas antioxidantes (Azooz y Youssef, 2010), como puede ser la catalasa, sin embargo niveles altos de AS no solo producen ROS por varios mecanismos, también inhiben actividad de enzimas antioxidantes como catalasa (CAT) y peroxidasa (POX) conduciendo a una sobreacumulación de ROS (Shi y Zhu, 2008). Geun-Choi *et al.* (2004) indican incrementos en la actividad de la CAT de más de 12 veces el testigo al aplicar AS (5 mM) en dihuang (*Rehmannia glutinosa* Gaertn), así como cambio en otras moléculas antioxidantes, Azooz (2009) en haba (*Vicia faba* L.) con tratamiento “priming” de 0.2 mM de AS previo a una condición de salinidad (0 y 140 mM de NaCl) encontró incrementos en la actividad enzimática de CAT (entre otras moléculas antioxidantes) variando los niveles de antioxidantes dependiendo del cultivar, encontrando el valor más

elevado de la CAT en el tratamiento de AS + NaCl (3.68 unidades  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  de PF), Deneshmand *et al.* (2009) en papa (*Solanum tuberosum* L.) reportan incrementos en la CAT (así como SOD, APX, y GR), cuando aplicó AS a 10  $\mu\text{M}$  (0.01 mM) y/o se sometió a condición salina (80 mM de NaCl) teniendo incremento en los valores de CAT (con respecto al testigo) cercanos a dos veces donde aplicó AS y cuatro veces donde aplicó NaCl, y determinado los valores más elevados de CAT (cercanos a ocho veces el testigo) cuando aplicó SA en presencia del NaCl, lo que permitió una adaptación al medio salino, El-Khallal *et al.* (2009) en maíz (*Zea mays* L.) al tratar la semilla con AS a 0.15 ppm (0.0011 mM) y germinar bajo condiciones de salinidad asperjando nuevamente con la misma concentración de AS (2 y 4 semanas después de germinación) encontró incrementos en la actividad de la CAT (así como SOD, POX y APX) a la tercer semana después de la germinación, en comparación con el control bajo estrés (50 y 100 mM de NaCl), presentado los valores más altos de CAT la aplicación conjunta de AS y NaCl, sin embargo a la quinta semana después de germinación la CAT presentó una disminución en dicho tratamiento, igualando a los testigos estresado y absoluto, suponiendo esta disminución al incremento del resto de las enzimas, las que pudiesen ser las degradadoras de los ROS después de 5 semanas bajo estrés, Noreen *et al.* (2009) encontraron incremento en CAT tras la aplicación de AS a 300  $\text{mg L}^{-1}$  (2.23 mM) en plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) cv. Hissun-33 bajo condiciones salinas (120 mM), así como un cambio nulo a dosis de AS de 100 y 200  $\text{mg L}^{-1}$  (0.75 y 1.5 mM) y en todas las dosis en el cultivar SF-187, este comportamiento entre cultivares es justificado a una sobreexpresión de genes a causa del AS dependiendo del cultivar manejado, siendo de igual importancia la etapa fenológica o el momento de la aplicación, tal y como lo encontró Ortega-Ortiz *et al.* (2007) en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) al aplicar AS (0.1 mM) en tres estados de desarrollo de fruto diferentes (amarre, crecimiento y cosecha) encontrando valores significativos de CAT con respecto al testigo (sin aplicación) únicamente en la aplicación sobre amarre de fruto. Sin embargo existen reportes donde la actividad de la CAT disminuye, Mahdavian *et al.*

(2007) reporta valores inferiores a 4 unidades  $g^{-1}$  de PF al aplicar AS (0.7 1.5 y 3.0 mM) sobre plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) y valores de CAT superiores a 10 unidades  $g^{-1}$  de PF donde aplicó AS a 6 y 9 mM, concluyendo que diferentes dosis de AS presentan diferentes resultados en la actividad de la CAT, de igual forma el tiempo bajo un estrés constante puede generar una dinámica de la CAT, alcanzando un máximo valor a un tiempo determinado después de la aplicación de AS o del factor de estrés, para disminuir posteriormente tal como lo reporta Promyou *et al.* (2012) en cinco cultivares de flores de anturio (*Anthurium andraeanum* L.) donde encontró efecto significativo en CAT al aplicar sumergiendo los tallos en AS (1 y 2 mM) y exponerlos a condiciones de bajas temperaturas (4 y 12 °C), alcanzando su máximo valor a los 12 días después del almacenaje para en adelante decaer siendo en todo momento superior al testigo sin aplicación y Zhang *et al.* (2009b) quienes reportan en pasto bermuda (*Cynodon dactylon* L. Pers.) una dinámica donde la actividad de CAT se ve disminuida a los cuatro y ocho días después de la aplicación de AS (0.1, 0.5 y 1.0 mM) bajo condiciones de bajas temperaturas, para al día 12 presentar un incremento significativo con respecto al testigo, explicando la función de defensa por medio de otras proteínas que pudiesen llevar los niveles de  $H_2O_2$  a regular las mismas sin dañar las células de los tejidos.

### **III. ARTICULO No. 1**

**FOLIAR ACCUMULATION OF SALICYLIC ACID IN TOMATO  
(*Solanum lycopersicum* L.) AFTER EXOGENOUS  
APPLICATIONS OF THE COMPOUND**

## Foliar accumulation of salicylic acid in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) after exogenous applications of the compound

---

Enrique Guzmán-Téllez<sup>1</sup>, Adalberto Benavides-Mendoza\*<sup>1</sup>, Daniel Díaz-Montenegro<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), Calzada Antonio Narro No.1923, Col. Buenavista, C.P. 25315, Saltillo, Coah., Méx., e-mail: abenmen@uaaan.mx

<sup>2</sup> Laboratorios Agroenzymas, S.A. de C.V., Vía Dr. Gustavo Baz 176-3, Col. San Jerónimo Tepetlaco, C.P. 54090, Tlalnepantla, Edo. Méx., México.

**Abstract.** Salicylic acid (SA) is used in agricultural practice for its stress tolerance induction effect. The aim of this study was to determine the dynamic change in the SA concentration in leaf tissue in response to the SA spraying in leaves of greenhouse grown tomato. Concentration of SA showed a dynamics similar to the one reported by induction under stress conditions. Two days after first application the SA foliar concentration reached the maximum of 8  $\mu\text{g g}^{-1}$ , i. e. twice the amount observed in the control plants. SA decreased until it reached the level of control plants eight days later. A second application showed actually the same response, but with a faster decline of SA in two days.

**Keywords:** *Salicylic acid, systemic resistance, tolerance inducing, elicitors.*

---

### Introduction

Plant hormones modify the growth and development of plants by inducing changes in cellular, physiological, and morphological processes [1, 2]. In recent years some new groups of hormones have been identified, such is the case of

**Resumen.** El ácido salicílico (AS) es utilizado en la práctica agrícola por su efecto de inducción de tolerancia al estrés. El objetivo de este estudio fue determinar el cambio en el tiempo de la concentración de AS en el tejido foliar de tomate en invernadero. La concentración de AS mostró un comportamiento dinámico similar al reportado para el AS que se induce por estrés. Dos días después de una primera aplicación la concentración de AS foliar alcanzó un máximo de 8  $\mu\text{g g}^{-1}$ , el doble de lo observado en el testigo y disminuyó hasta igualarse ocho días después. Una segunda aplicación mostró prácticamente la misma respuesta, pero con más rápida disminución del AS, igualando a la concentración del testigo en dos días.

**Palabras clave:** *Ácido salicílico, resistencia sistémica, inductores de tolerancia, elicitores.*

---

salicylates, which are also involved in controlling plant growth and development. They also act as signals in the processes leading to plants adaptive responses to environment. Salicylic acid is found naturally in plants, it plays an important role in growth and stress tolerance [3, 4, 5], in addition to participate of the internal signals regulating the defensive response of plants against

pests, pathogens [6, 7] and abiotic factors [2, 4, 8]. When exogenously applied, SA induces stress tolerance, enhancing the plant's biological response against salinity and temperature extremes, in addition to modifying the antioxidants, nutrients, and chlorophyll concentrations [9, 10].

Taking into account the positive results found in several studies, the use of salicylates in agricultural practice seems to have possibilities from a commercial point of view [11-20]. Every day seems more obvious that the use of such compounds becomes a need, considering that current agricultural production standards demand a reduction of pesticide usage [21]. In a practical sense, the scientific literature and technical works made for the development and legal registration of products with active ingredients containing tolerance inducing compounds such as salicylic acid, describe the biological changes that occur in plants, for instance the activity adjustments of enzymes, antioxidants, and other metabolites [22-24] and changes in tolerance to environmental factors [20]. A lesser attention has received the residence time of the compound, as well as the behavior of the concentration of salicylates in plant tissues, and its residual effect as a result of a foliar application.

The objective of this study was to determine the dynamic behavior of salicylic acid concentration in the leaf tissue of plants, in response to exogenous application of this compound in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaves under greenhouse conditions.

## Results and Discussion

### SA dynamics in leaves

After the exogenous SA application the concentration reached a peak two days after the application startup (DAAS) and then gradually decreased to a concentration statistically equal to that of the control plants 10 days after application (Figure 1). After the second application of exogenous SA at 14 DAAS, a similar response to the one obtained in the first application was observed. However, with the aim of increasing the information obtained after this second application leaf tissues were collected not allowing the two days to elapse. In order to achieve the data the sampling was made at 8, 14 and 24 hours after the application, finding a significant response at 24 hours (15 DAAS). After this, the response was almost the same described for the first application.

This dynamic behavior in the SA concentration in tomato leaves, induced by exogenous applications of this compound, is consistent with those reported by He *et al.* [25] when applying the red spider mite *Tetranychus urticae* (Koch) on bean leaves (*Phaseolus vulgaris* L.) and by Ogawa *et al.* [8] in *Arabidopsis* when applying mechanical stimuli on the leaves. The above mentioned authors found significant increments in the concentration of foliar SA, with maximum peaks at 24 hours after stimulation, to later start a concentration decrease, with a maximum accumulation time similar to the one found in this study. This suggests a similarity in the temporal SA dynamics after an exogenous application and after a stress



stimulus. Similarly, the inoculation of pathogens in the cotyledons of cucumber seedlings (*Cucumis sativus* L.) with *Pseudomonas* [26] and tobacco necrosis virus (TNV) [27], led to increments in the SA concentration in the leaves of seedlings. The peak SA concentration appeared 18 hours after the *Pseudomonas* inoculation and decreased on, while for TNV inoculation it showed up four days after inoculation, equaling the concentration of non inoculated plants eight days after inoculation, similarly to the observed in this assay. The described dynamics may vary depending on the organs being tested in a plant. For instance, if the inoculation of the virus occurs in the tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cotyledons, instead of a decrease in the SA concentration in the cotyledons at the time mentioned above, there is an increment during the different periods of evaluation. This phenomenon is accompanied, however, by the same behavior described for leaves, where the fall of the SA concentration appears after 48 hours [28-31].

Norman *et al.* [22] applied the SA in concentrations of 1.0, 0.1 and 0.01 mM in tobacco cell cultures, making a subsequent measurement of the cytoplasmic concentration of the compound. The authors found out that even in this situation, the SA showed a high concentration in cells for up to 24 hours when applying 1.0 mM, whereas for concentrations of 0.1 and 0.01 mM the permanence time of the compound in the cells was only one hour.

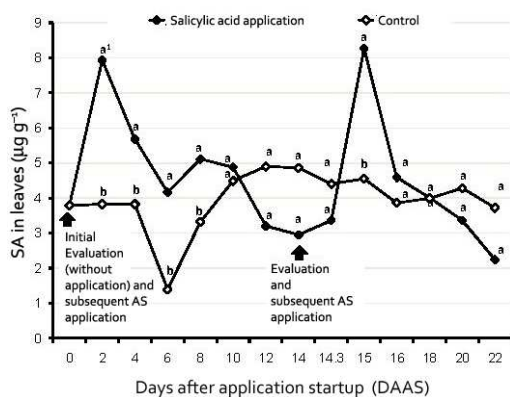
The presence of high SA concentrations in leaves subjected to biotic or abiotic stress is attributed to its role as a signaling compound in the induction of

acquired systemic resistance [21, 31, 32]. In the absence of an evident stress to induce the SA synthesis, and in the presence of exogenous SA applications made in this work, the observed concentrations could be attributed to the balance between the residual life and the transformation, or degradation, of applied SA. It is assumed that the cellular SA concentration must be kept within certain limits, at an appropriate level to maintain cellular redox homeostasis, according to the needs imposed by the environment, particularly by irradiance [33] as well as by SA interaction with other cellular activities [34].

The second application made in this work showed a different result from the first one, since after reaching its SA peak accumulation it showed a faster decrease as compared to the first one.

The rapid change in the detectable SA amount, after the peak concentration, seems to be partially due to the SA transformation into its conjugated forms [25, 35, 36] mainly as glycosides of salicylic and benzoic acid, methylated forms, or species activated with coenzyme A [37]. Meanwhile Mustafa *et al.* [38] found out in *Catharantus roseus* (L.) cell cultures, that the SA applied to the medium, and absorbed by the cells, was metabolized into 2.5-hydroxybenzoic glucoside. The same happens in *Arabidopsis thaliana* under mechanical stress [8] where O- $\beta$ -D-glucosyl benzoic acid is accumulated in nearly twice the amount found in SA, i.e. 3 to 7 mM. Once the SA changes into its conjugated form it is supposed to form a kind of reserve that, if necessary, can be converted back to SA [37]. Panina *et al.* [39] observed the transformation of SA

conjugates in free SA within 48 h. in potato disks infected with *Phytophthora infestans*.



**Fig. 1.** Concentration dynamics of SA in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaves in response to its exogenous application at  $10^{-4}$  M ( $0.0138 \text{ g L}^{-1}$ ). Mean comparison performed between the witness and the treated one (SA application) every two days. Evaluation made every two days on the third fully expanded young leaf. Each point is an average of two plants, with two replications each, tested on Agilent 1120 LC chromatograph under EZCrom software. Means with the same letter are statistically equal (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

The possible reason why the SA concentration decreased more rapidly after the second application, as compared to the first one, is due to the fact that stress response induced systems are very responsive to the presence of the inducing compound or compounds, but a second or third application made shortly after the first one usually saturates the response [40]. One might think that this is the situation observed in the second application, and that as the response saturation increases, more rapidly is metabolized the SA in plant tissues.

As far as it is concerned, the SA did not show a sensible variation in the control plants, except for the evaluation of the sixth DAAS where it showed a similar change to

the one showed by the treated plants (Figure 1). SA has natural concentration variations arising out of development events such as different phenological stages, and flowering [41]. It is also known that constant adjustments take place in the SA concentration depending on the conditions of temperature and irradiance [33]. Thus, the behavior displayed by the control plants, in terms of variations in the foliar SA concentration, can be assumed to be normal.

### Change in SA concentrations

SA concentrations established in treated plants in this assay ranged from 3.0 to  $8.27 \mu\text{g g}^{-1}$  fresh weight (Figure 1), these values exceeded almost twice the ones observed in the control plants (whose concentrations ranged from 1.39 to  $4.9 \mu\text{g g}^{-1}$  fresh weight). The maximum values found after application (at two and 15- DAAS) are similar to those reported by He *et al.* [25] on bean leaves 24 hours after stimulation with the spider mite *Tetranychus urticae* Koch. In this case, the presence of mites gave place to a maximum concentration of  $12 \mu\text{g g}^{-1}$  SA of fresh weight, a value that exceeds the obtained with an exogenous SA application as a foliar spray. With another biological model, the infection with tobacco mosaic virus (TMV), Enyedi *et al.* [28] found out that infected cells reached 3.5 to  $6.0 \mu\text{g g}^{-1}$  144 hours after SA application in the culture medium in concentrations of 25 and  $100 \mu\text{M}$  SA. In the same way, Malamy *et al.* [42] found an increase of  $3 \mu\text{g g}^{-1}$  at 60 hours after putting tobacco plants under high temperatures, while Shulaev *et al.* [29]

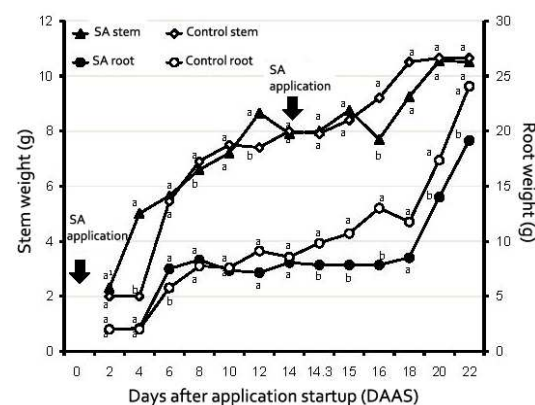
assayed maximum SA concentrations in TMV infected tobacco, equivalent to  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  fresh weight, increasing the concentration as the sample approached the site of infection (144 hours after it). On the other hand, Barbaus-Larson and Jacobsen [43], when applying 50 ppm probenazole (a compound used in agricultural practice for their ability to induce tolerance) in sugar beet (*Beta vulgaris* L.), found the highest SA concentration in  $3.1 \mu\text{g g}^{-1}$  fresh weight. Iwai et al. [50], applying the same compound on rice plants, found  $1.5 \mu\text{g g}^{-1}$  fresh weight, at the time of the highest accumulation. It is clear that the endogenous SA concentration values depend on the type of test applied, and the conditions under which it takes place, remain a constant partial transformation of the free SA into its conjugated forms, even if the response shows very high SA concentrations, and time responses as short as 30 minutes [22].

Even those studies reporting lower SA concentrations, as the ones obtained by Park *et al.* [31] and Yalpani *et al.* [36] in the order of  $0.35 \mu\text{g g}^{-1}$  fresh weight, 144 hours after infecting the plants with TMV, showed the same dynamics described above of SA increments in the concentration, and of a subsequent decline, presumably to incorporate into conjugated chemical species.

### Plant growth

As far as stems and leaves growth are concerned, some differences were found at 4, 12 and 15 DAAS (Figure 2), but values were similar at the end of the assay. In the absence of stress, the SA effect will depend

on the concentration applied, and the plant species where the application is done, but sometimes no effect is found [9, 45]. Generally speaking, the use of SA as a foliar spray shows a benefit on the growth of the aerial parts of plants in situations where some stressors are present [12, 17, 20, 46-48].



**Fig. 2.** Growth of stem, leaves, and roots of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants in response to foliar spraying with SA  $1 \times 10^{-4}$  M ( $0.0138 \text{ g L}^{-1}$ ). Comparison of means between the control and the treated one (SA application) every two days. Each point is an average value of three plants. Means with the same letter are statistically equal (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).

In the case of root weight no significant difference was found after the first SA spraying, however, after the second application a lower root growth in the treated plants was observed. Most of the literature indicated that SA effect on root growth is positive [10, 11, 12, 17, 49, 50], but in some studies like in Lian *et al.* [45] negative effects were found in root biomass in some of the applied concentrations. The authors indicated, as a probable explanation of the results, an increased derivation of the energy estimates of root defense responses induced by SA.

## Conclusions

Concentration of SA, resulting of a foliar application, showed a dynamics of accumulation and subsequent decline similar to the one reported by induction under stress conditions. The effect was repeated twice in two foliar spray events.

Salicylic acid applied as a foliar spraying increased the foliar concentration of the compound to  $8 \mu\text{g g}^{-1}$  fresh weight as compared with the control that showed a maximum value of  $5 \mu\text{g g}^{-1}$ .

According to the results of this assay the SA applications carried out for purposes of agricultural practices on tomato plants, should be performed within a minimum interval of eight days among applications.

## Experimental

### Test Location

The work was carried out in the facilities of the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), Buenavista, Saltillo, Coahuila, Mexico.

### Vegetative material

The study was carried out on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants cv. Rio Grande (Petoseed). The seeds were sown on October 8, 2010, directly in polystyrene containers with 0.32 L substrate peat moss, TKB and agrolite 70:30 (v/v), placing 3 seeds per container. Ten days after germination a single seedling was preserved in each container. Fertilization was

performed from 12 days after germination using Steiner solution at 25%. Initially, 30 mL of solution per seedling a day were applied, 30 days after germination the amount of nutrient solution was increased to 50 mL per seedling a day. Plants were grown under greenhouse conditions.

### Description of treatments and application

The assay consisted of two treatments: SA and a control (distilled water). SA was reagent grade (CTR Scientific) at a concentration of  $1 \times 10^{-4}$  M ( $0.0138 \text{ g L}^{-1}$ ). The first application was performed using a hand spray early in the day, applying the needed amount in order to achieve a full coverage of the leaves 30 days after germination (08 November), once the seedlings showed the third true leaf. Twelve days after the first application of this compound a second one was made.

### Collection of plant material for the assay.

The third developed leaf was taken as the organ to be evaluated. The first sampling of foliar material was made before the SA application to be able to conduct the evaluations and determine the initial concentration of SA in leaf tissue. The leaves were cut off from the plant, wrapped in aluminum foil and labeled before being, immediately, immersed in liquid nitrogen and be transferred to storage to a freezer at  $-2.0$  °C in order to preserve them. After the SA application the previous operation was repeated every two days during a period of 22 days, taking the leaves of two plants per

treatment every time. The sampling time was between 8:00 and 11:00 hour.

### **SA determination**

The process of analysis consisted of two phases: 1) preparation of the sample for extraction, 2) assaying of SA concentration in the obtained extract. For the preparation of the extraction samples the collected vegetative material was refrozen with liquid nitrogen for subsequent grinding and weighing of 0.05 g placing it in a 1.5 mL ependorf tube, adding 1 mL of the extraction solution (10% methanol: 1% acetic acid: 89% distilled water) using for this purpose an automatic pipette (PRO Accumax 100-1000  $\mu$ L). In order to get contact of the extraction solution and the total mass of the sample, the ependorf tube was put to vibration for 20 seconds on a vortex mixer (Scientific Products S. A.) and later on, in order to degas it, it was put for 5 minutes in a degasser (Bronson S.A.) and then was centrifuged for 10 minutes at 10,000 G in a spectrofuge centrifuge (Labnet International, Inc.). After this process, translucent supernatant was recovered by a hand pipette to place it in a new labeled ependorf tube. A new amount of 0.5 mL of the extraction solution was added to each ependorf tube with the plant sample, in order to repeat the whole procedure, and remove again the translucent supernatant and add it to a new labeled ependorf tube obtaining, this way, an approximately 1.5 mL of solution, which was passed through spinning filters of 0.45  $\mu$ m (Millipore syringe-driven filter unit). The SA assay was done on the filtering results using an LC Agilent chromatograph,

model 1120 managed under EZChrom Elite Compact software, ver. 3.3.0B (Agilent 2005-2008MR) under the following conditions: the chromatograph separation was performed in a Phenomenex Luna C18 100x20 mm at 35 °C column, with two solvent gradients 100% A (94.9% H<sub>2</sub>O: 5% CH<sub>3</sub>CN: 0.1% CHOOH), to 100% B (5% H<sub>2</sub>O: 94.9% CH<sub>3</sub>CN: 0.1% CHOOH) for 10 min. Solvent B was injected in the last minute, to later on inject again solvent A to clean up the system and perform the subsequent injection for a new extraction solution. The injection of the extraction solution consisted of 20  $\mu$ L. Each leaf sample was analyzed in duplicate. The results of SA obtained by the chromatograph in mg L<sup>-1</sup> were converted to  $\mu$ g of SA per gram of fresh weight.

### **Determination of root and stems and leaf weight**

The root weight, and the weight of the stems and leaves, was determined taking, randomly, three plants per treatment. For the root, the substrate was removed with running water until the particles adhered were eliminated, and it was weighed in a grain balance. Once the fresh weight was obtained, the sample was dried at 60 °C in a drying oven. As for the weight of stems and leaves the measuring was done directly on a triple beam balance (Ohaus, 2620 g).

### **Experimental design and data analysis**

A completely randomized experimental design was used, taking as the experimental unit one plant in one container,

and taking two plants per treatment per evaluation for SA determination, and three plants for determination of root weight and stems and leaves weight per treatment per evaluation. Each treatment consisted of 80 replications. The data obtained were analyzed using analysis of variance, and mean's test using Tukey's test ( $\alpha = 0.05$ ). The software used was SAS for Windows.

## References

1. Browse, J. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2009**, *60*, 183-205.
2. Ashraf, M., Akram, N. A., Arteca, R. N. and Foolad, M. R. *Critical Reviews in Plant Sciences.* **2010**, *29*, 162-190.
3. Noreen, S., Ashraf, M., Hussain, M., and Jamil, A. *Pakistan Journal Botanic.* **2009**, *41*, 473-479.
4. Khan, N., Syeed, S., Masood, N., Nazar, R., and Iqbal, N. *International Journal of Plant Biology.* **2010**, *1*, DOI: 10.4081/pb.2010.e1
5. Purcarea, C. and Cachita-Cosma, D. *Studia Universitatis, "Vasile Goldis" Seria Stiintele Vietii.* **2010**, *20*, 63-68.
6. Girling, R., Madison, R., Hassall, M., Poppy, G., and Turner, J. *Journal of Experimental Botany.* **2008**, *59*, 3077-3085.
7. Zhang, Z., Li, Q., Li, Z., Staswick, P., Wang, M., Zhu, Y., and He, Z. *Plant Physiology.* **2009**, *145*, 450-464.
8. Ogawa, T., Ara, T., Aoki, K., Suzuki, H., and Shibata, D. *Plant Biotechnology.* **2010**, *27*, 205-209.
9. Benavides-Mendoza, A., Salazar-Torres, A., Raírez-Godina, F., Robledo-Torres, V., Ramírez-Rodríguez, H. y Maiti., R. *Terra Latinoamericana.* **2004**, *22*, 41-47.
10. Noreen, S. and Ashraf, M. *Journal of Botany.* **2008**, *40*, 1657-1663.
11. Gutierrez-Coronado, M., Trejo-Lopez, C. and Larqué-Saavedra, A. *Plant Physiology and Biochemistry.* **1998**, *36*, 563-565.
12. Khodary, S.E.A. *International Journal of Agriculture and Biology* **2004**, *6*, 5-8.
13. Gemes, K., Poor, P., Sulyok, Z., Szepesi, A., Szabo, M. and Tari, I. *Acta Biologica Szegediensis.* **2008**, *52*, 161-162.
14. Noreen, S. and Ashraf, M. *Journal of Plant Physiology.* **2009**. doi:10.1016/j.jplph.2009.05.005.
15. Azooz, M. *International Journal of Agriculture and Biology.* **2009**, *11*, 343-350.
16. Jabbarzadeh, Z., Khosh-Khui, M. and Salehi, H. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.* **2009**, *3*, 4693-4696.
17. Najafian, S., Khoshkhui, M., Tavallali, V., and Saharkhiz, M. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.* **2009**, *3*, 2620-2626.
18. El-Khallal, S., Hathout, T., Ahsour, A. and Kerit, A. *Research Journal of Agriculture and Biological Science.* **2009**, *5*, 391-402.
19. Villanueva-Couoh, E., Alcantar-González, G., Sánchez-García, P., Soria-Fregoso, M. and Larque-Saavedra, A. *Revista Chapingo, Serie Horticultura.* **2009**, *15*, 25-31.
20. Azooz, M., and Youseef, M. *American Journal of Plant Physiology.* **2010**, *5*, 56-70.
21. Esmailzadeh, M., Soleimani, M. and Rouhani, H. *Journal of Biological Science.* **2008**, *8*, 1039-1044.
22. Norman, C., Howell, K., Millar, A., Whelan, J. and Day, D. *Plant Physiology.* **2004**, *134*, 492-501.
23. Kaydan, D., Yagmur, M. and Okut, N. *Tarim Bilimleri Dergis.* **2007**, *13*, 114-119.
24. Khalili, M., Hasanloo, T., Kasemi-Tabar, S. and Sepehrifar R. *Journal of Medicinal Plants.* **2010**, *9*, 51-61.

25. He, W., Li, H., Li, X., Li, M. Chen, Y. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **2007**, 88, 78-81.
26. Rasmussen, J., Hammerschmidt, R. and Zook, M. *Plant Physiology*. **1991**, 97, 1342-1347.
27. Molders, W., Buchala, A. and Metraux, J. *Plant Physiology*. **1996**, 112, 787-792.
28. Enyedi, A., Nalpani, N., Silverman, P. and Raskin, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1992**, 89, 2480-2484.
29. Shulaev, V., León, J. and Raskin, I. *The Plant Cell*. **1995**, 7, 1691-1701.
30. Seskar, M., Shulaev, V. and Raskin, I. *Plant Physiology*. **1998**, 166, 387-392.
31. Park, S., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S. and Klessig, F. *Science*. **2007**, 318, 113-116.
32. Prithviraj, B., Bais, H., Weir, T., Suresh, B., Najarro, E., Dayacar, B., Swheizer, H. and Vivanco, J. *Infection and Immunity*. **2005**, 73, 5319-5328.
33. Mateo, A., Funck, D., Mühlenbock, P. Kular, B., Mullineaux, P., and Karpinski, S. *Journal of Experimental Botany*. **2006**, 57, 1795-1807.
34. Genoud, T., Buchala, A.J., Chua, N.H., Metraux J.P. *Plant Journal*. **2002**, 31, 87-95.
35. Klämbt, H.D. *Nature*. **1962**, 196, 491.
36. Yalpani, N., Silverman, P., Kleier, D. and Raskin, I. *The Plant Cell*. **1991**, 3, 809-818.
37. Wildermuth, M.C. *Current Opinion in Plant Biology*. **2006**, 9, 288-296.
38. Mustafa, N., Kin, H., Choi, Y. and Vepoorte, R. *Biotechnol Lett*. **2009**, 31, 1967-1974.
39. Panina, Y., Gerasimova, N., Chalenko, G., Vasyokova, N., Oseretskovskaya, O. *Russian Journal of Plant Physiology*. **2005**, 52, 511-515.
40. Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Zou, G., Katagiri, F. *Plant Cell*. **2003**, 15, 317-330.
41. Abreu, M. and Munne-Bosch, S. *Journal of Experimental Botany*. **2009**, 60, 1261-1271.
42. Malamy, J., Hennig, J. and Klessig, D. *The Plant Cell*. **1992**, 4, 359-366.
43. Barbaus-Larson, R. and Jacobsen, B. *Journal of Sugarbeet Research*. **2007**, 44, 17-35.
44. Iwai, T., Seo, S., Mitsuhashi, I. and Ohashi, K. *Plant Cell Physiology*. **2007**, 48, 915-924.
45. Lian, B., Zhou, X. and Mirasari, D. L. *Journal of Agronomy and Crop Science*. **2000**, 185, 187-192.
46. Wang, L., Fan, L., Loescher, W., Duan, W., Liu, G., Cheng, J., Luo, H. and Li, S. *Plant Biology*. **2010**, 10, 34.
47. Chandra, A., Anand, A. and Dubey, A. *Journal of Environment Biology*. **2007**, 28, 193-196.
48. Karlidag, H., Yildirim, E., and Turan, M. *Science Agriculture (Piracicaba, Braz.)*. **2009**, 66, 180-187.
49. Tuna, A., Kaya, C., Dikilitas, M., Yokas, I., Burum, B. and Altunlu, H. *Pakistan Journal of Botany*. **2007**, 39, 787-798.
50. Umebese, C., Olatimilehin, T. and Ogonsusi, T. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. **2009**, 4, 224-229.

#### **IV. ARTICULO No. 2**

**RESIDUALIDAD DEL ACIDO SALICÍLICO Y SU EFECTO EN LA  
ACTIVIDAD DE LA CATALASA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE  
TOTAL EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)**



# Residualidad del ácido salicílico y su efecto en la actividad de la catalasa y capacidad antioxidante total en tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Enrique Guzmán-Téllez, Adalberto Benavides-Mendoza\*, Rosalinda Mendoza-Villarreal, Homero Ramírez y Alberto Flores-Olivas

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro No.1923, Col. Buenavista, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila, México

---

\*Autor para correspondencia: abenmen@uaaan.mx

## Resumen

El ácido salicílico (AS) es utilizado en la práctica agrícola por su efecto de inducción de tolerancia al estrés. El objetivo de este estudio fue determinar la concentración foliar de AS, así como el cambio en la actividad de catalasa (CAT) y en la capacidad antioxidante total (TAC) resultantes de la aplicación exógena del AS en el tejido foliar de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en invernadero bajo dos condiciones de salinidad (0 y 100 mM de NaCl). Se verificó igualmente el efecto de los tratamientos sobre el rendimiento de fruto. Los tratamientos manejados fueron: 1) AS + 100 mM NaCl, 2) AS + 0 mM NaCl, 3) Agua + 100 mM de NaCl, y 4) Agua + 0 mM de NaCl. Como respuesta a las aplicaciones de AS ( $10^{-4}$  M) aplicado cada 15 días, la concentración de AS en el tejido foliar mostró un comportamiento dinámico similar al reportado por varios autores para la concentración del AS cuando la acumulación de este compuesto es inducida por estrés. Un comportamiento similar fue determinado en la actividad de CAT y en la TAC días después de la aplicación foliar de AS: incrementando el valor a las 24 h, alcanzando sus valores máximos a las 48 h para caer a las 144 h, repitiéndose la respuesta descrita después de cada aplicación del AS. La aplicación de 100 mM de NaCl por sí sola no produjo efecto sobre la concentración del AS, la actividad CAT y en la TAC, sin embargo mostró reducción en el peso de fruto. La aplicación de AS foliar en ausencia de NaCl, incrementó significativamente el AS, actividad CAT y TAC, sin repercutir en el peso de fruto. La aplicación de AS en combinación con 100 mM de NaCl presentó los valores más elevados de AS, actividad CAT y TAC, sin modificar el

peso de fruto. Lo anterior indica que el efecto residual del AS al aplicarse cada 15 días a  $10^{-4}$  M, induce una dinámica con valores significativos de moléculas relacionadas con tolerancia al estrés (CAT, ANT y el mismo AS) que incrementan el peso de fruta bajo condiciones sin estrés manifiesto, contrario a una condición salina 100 mM de NaCl.

**Palabras clave:** Ácido salicílico, inductores de tolerancia, elicitores, catalasa, antioxidantes

## Introducción

Los salicilatos están involucrados en el control del crecimiento y desarrollo de la planta, actuando también como señalizadores en los procesos de ajuste frente al ambiente (Ashraf *et al.*, 2010). Dentro de este grupo de compuestos se encuentra el ácido salicílico (AS), el cual es un componente natural de las plantas que regula el crecimiento y la tolerancia al estrés abiótico (Zhang *et al.*, 2009b; Khan *et al.*, 2010; Purcarea and Cachita, 2010; Hussain *et al.*, 2011) y biótico, esto último al regular señales internas o activación de genes que estimulan la formación de compuestos que auxilian en la defensa de las plantas contra plagas y patógenos o que generan atracción para los depredadores (Girling *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009a). Al aplicar el ácido salicílico de forma exógena se induce tolerancia al estrés, mejorando la respuesta biológica de la planta frente a factores adversos de crecimiento (Noreen and Ashraf, 2008; Noreen *et al.*, 2009; Poor *et al.*, 2010) y modifica una gran cantidad de respuestas metabólicas y fisiológicas como la concentración de pigmentos fotosintéticos (Kaidan *et al.*, 2006; Gharib, 2007; Azooz y Yousef, 2010), la concentración de minerales, carbohidratos y proteínas (Gharib, 2007; Hussain *et al.*, 2007; Karlidag *et al.*, 2009; Mustafa *et al.*, 2009; Azooz y Yousef, 2010), así como otros metabolitos de la vía de los fenilpropanoides (Mustafa *et al.*, 2009) y algunos compuestos antioxidantes (Azooz, 2009; Khalili *et al.*, 2010).

La utilización del ácido salicílico en la práctica agrícola ha mostrado buenos resultados en diferentes cultivos (Khodary, 2004; Gemes *et al.*, 2008; Noreen y Ashraf, 2008; Azooz, 2009; Jabbarzadeh *et al.*, 2009; Najafian *et al.*, 2009; Noreen and Ashraf, 2009; El-Khallal *et al.*, 2009; Villanueva *et al.*, 2009; Azooz and Youssef, 2010), y es cada vez más claro el uso comercial de estos compuestos para disminuir el uso de plaguicidas (Endreva, 2004; Esmailzadeth *et al.*,

2008). La literatura científica y los trabajos técnicos realizados para el desarrollo y registro legal de productos cuyos ingredientes activos contienen compuestos inductores de tolerancia como el ácido salicílico, describen los cambios biológicos (bioquímicos, fisiológicos y morfológicos) que se presentan en las plantas como respuesta a la aplicación o inducción del AS, buscando cambiar la tolerancia frente a cierto factor ambiental o elevar el rendimiento de las plantas (Khalili *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2010; Azooz and Youssef, 2010). Se sabe poco sin embargo, acerca de la dinámica de la concentración del AS cuando se aplica de forma exógena sobre los tejidos vegetales, así como su efecto sobre algunos caracteres bioquímicos como la capacidad antioxidante. El contar con esta información puede aportar a la mejora del uso agrícola de este compuesto.

El presente estudio tuvo por objetivo determinar el cambio a través del tiempo de la concentración de AS, así como la modificación en la actividad catalasa (CAT) y en la capacidad antioxidante total (TAC), posteriores a la aplicación de AS en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo invernadero en dos condiciones de salinidad inducida con NaCl. Se verificó asimismo la repercusión de estos factores sobre el peso de fruto.

## Materiales y Métodos

**Ubicación del ensayo.** El trabajo se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

**Material vegetativo.** Se utilizaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Rio Grande (Petoseed). Para obtenerlas, se sembraron semillas sobre la mezcla comercial Berger BM2® (Turba fina:perlita:vermiculita 70:15:15 v/v) en charolas de poliestireno de 200 cavidades. Al presentar 3 hojas verdaderas las plántulas se trasladaron a macetas de 20 L conteniendo el mismo sustrato. La aplicación de fertilizantes minerales se realizó a partir del quinto día después del trasplante manejando una solución Steiner (Steiner, 1961) diluida al 25% y alcanzando el 100% de la concentración al presentar los primeros frutos (35 días después del trasplante).

**Descripción de tratamientos y aplicación.** Se manejaron cuatro tratamientos a partir de los dos factores experimentales: aplicación foliar de ácido salicílico (AS) y aplicación de NaCl en el sustrato. El AS se aplicó foliarmente a una concentración de  $10^{-4}$  M ( $0.0138 \text{ g L}^{-1}$ ), utilizando ácido salicílico ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ ,) grado reactivo (CAS 67-72-7, CTR Scientific, México), y el NaCl se aplicó en concentración de 0 y 100 mM al medio de cultivo. Los cuatro tratamientos fueron: 1) aplicación foliar de AS + 0 mM de NaCl en el sustrato, 2) aplicación foliar de AS + 100 mM de NaCl en el sustrato, 3) aplicación foliar de agua + 100 mM de NaCl en el sustrato y 4) aplicación foliar de agua + 0 mM de NaCl en el sustrato (control).

Las aplicaciones foliares de agua y AS se realizaron a los 15, 30 y 45 días después del trasplante. Las aplicaciones se realizaron a temprana hora del día con un aspersor manual, aplicando el volumen necesario para obtener una cobertura total del área foliar y colocando un barrera plástica entre maceta y maceta para evitar la contaminación entre tratamientos.

La aplicación del NaCl (CTR Scientific, México) se realizó añadiéndolo a la solución nutritiva Steiner (Steiner, 1961), iniciando el tratamiento a los 10 días después del trasplante y manteniéndose así durante 60 días. La solución nutritiva fue aplicada cada dos días hasta el día 30 después del trasplante, posteriormente fue aplicada diariamente. En todos los tratamientos se realizaron lavados del sustrato cada 10 días aplicando agua (1 L por maceta) para evitar la acumulación excesiva de sales.

**Colecta de material vegetal para las determinaciones de ácido salicílico, actividad catalasa y capacidad antioxidante total.** Se tomo como unidad experimental una planta, tomando como muestra para evaluación la tercera hoja completamente desarrollada a partir del ápice, descartando para posteriores evaluaciones toda aquella planta que fuera muestreada. En cada tratamiento y tiempo de muestreo se colectaron hojas de dos plantas diferentes elegidas al azar. Cada tratamiento constó de 50 repeticiones.

El material foliar para la determinación del ácido salicílico y actividad catalasa se colectó por primera vez de forma previa a la aplicación de los tratamientos de aspersión con ácido salicílico y posteriormente a las 12, 24, 48, 144 y 240 h después de cada aplicación. Por otra parte, las muestras foliares para la medición de la capacidad antioxidante total se recolectaron 48 y 144 h después de cada aplicación.

Las hojas cortadas para la determinación de AS fueron envueltas en papel aluminio previamente etiquetado e inmediatamente introducidas en nitrógeno líquido para posteriormente almacenarse a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Por su parte, las muestras para verificar la actividad catalasa y la capacidad antioxidante total se colocaron en una hielera a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y en nitrógeno líquido, respectivamente, y se llevaron al laboratorio para procesarse de inmediato.

**Determinación del ácido salicílico (AS).** Se realizó por medio de la técnica modificada de Forcat *et al.* (2008), la cual consta de dos fases: 1) Preparación de la muestra para la extracción, y 2) determinación de la concentración de ácido salicílico en el extracto obtenido. En la fase uno el material vegetal congelado fue molido en un mortero aplicando constantemente nitrógeno líquido, se colocaron 0.05 g del tejido molido en un tubo ependorf de 1.5 ml, donde se agregó 1 ml de la solución de extracción (10% de metanol: 1% de ácido acético: 89% agua destilada), posteriormente se sometió a vibración por 20 segundos en un agitador vortex (Scientific products), y se desgasificó durante 5 minutos en un desgasificador Bransom modelo 1510, para posteriormente centrifugarlo en una microcentrífuga (Labnet International modelo 24D) durante 10 minutos a 10000 gravedades (10400 rpm). Después de este proceso se recuperó el sobrenadante traslúcido con pipeta manual y se colocó en un tubo ependorf nuevo y etiquetado. A los tubos ependorf que inicialmente contenían la muestra vegetal se les agregaron nuevamente 0.5 ml de la solución de extracción y se repitió todo el procedimiento, obteniendo así un aproximado de 1.5 ml de solución con el compuesto buscado. Esta solución se pasó a través de filtros syringe-driven filter unit de  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  (Millipore) y al extracto se le determinó el ácido salicílico con un cromatógrafo LC marca Agilent modelo 1120, bajo el programa computacional EZChrom Elite Compact versión 3.3.0B (Agilent 2005-2008), la separación se llevó a cabo en una columna Phenomenex Luna C18 de  $100\times 20\text{ mm}$  a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , manejando dos gradientes de solventes 100% A (94.9%  $\text{H}_2\text{O}$ : 5%  $\text{CH}_3\text{CN}$ : 0.1%  $\text{CHOOH}$ ) a 100% B (5%  $\text{H}_2\text{O}$ : 94.9%  $\text{CH}_3\text{CN}$ : 0.1%  $\text{CHOOH}$ ) por 10 min, utilizando  $20\text{ }\mu\text{l}$  de extracto. Cada muestra de hoja fue analizada por duplicado. Los resultados obtenidos mediante el cromatógrafo en  $\text{mg L}^{-1}$  de AS fueron convertidos a  $\mu\text{g}$  de AS por g de peso fresco.

**Determinación de la actividad enzimática de la catalasa (CAT).** La determinación de actividad de CAT se llevó a cabo el mismo día de la recolección de la muestra foliar, utilizando la técnica

descrita por Masia (1998). Se pesaron 0.5 g de la lámina foliar en una balanza analítica marca AHUS modelo Pioneer y se maceraron en un mortero, adicionando 50 mg de polyvinylpyrrolidone (Sigma-Aldrich) y 5 ml de solución buffer fosfato 100 mM a pH 7.0. La mezcla obtenida se llevó a tubos ependorf para ser centrifugados en microcentrifuga a 11000 gravedades (11440 rpm) por 11 minutos. El sobrenadante obtenido se diluyó 1:10 con agua destilada. De la dilución se tomó 1 ml y se le agregaron 3 ml de buffer fosfato 300  $\mu$ M, para posteriormente adicionar 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ M. La reacción entre la CAT y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue detenida después de transcurrir un minuto aplicando 10 ml de ácido sulfúrico al 2 %. Posteriormente se tituló con permanganato de potasio 0.01 N. Bajo el mismo procedimiento se realizó un blanco con agua destilada. La actividad de la catalasa se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{CAT} = \frac{(\text{VT}-\text{VM}) (\text{Concentración del KMnO}_4)}{(\text{Muestra / ml de NaKPi})(\text{DF muestra / ml NaKPi final})}$$

En donde: VT = Volumen de KMnO<sub>4</sub> gastado en el blanco (ml); VM = Volumen de KMnO<sub>4</sub> gastado en la muestra (ml); Concentración del KMnO<sub>4</sub> en moles; Muestra = peso de tejido utilizado; NaKPi = amortiguador de fosfato de sodio (5 ml); DF muestra = dilución final de la muestra; NaKPi final = cantidad final de amortiguadores de fosfato de sodio utilizado (8 ml). Se definió una unidad de catalasa como la cantidad de enzima necesaria para descomponer 1  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto por gramo de tejido (Masia, 1998).

**Determinación de la capacidad antioxidante total (TAC).** La determinación de la capacidad antioxidante total se realizó el mismo día de la recolección de la muestra foliar, utilizando la técnica descrita por Ramírez *et al.* (2006). Las hojas fueron congeladas con nitrógeno líquido y molidas en mortero para tomar 4 g de muestra a la que se agregaron 8 ml de buffer fosfato 100 mM a pH 7.0. Posteriormente la muestra se agitó durante 2 min en un agitador vortex (Scientific products), para posteriormente ser centrifugada a 2880 gravedades (3000 rpm) durante 10 minutos. Se utilizó el kit para determinación de la capacidad antioxidante total de Calbiochem® (Miller *et al.*, 1993), tomando del sobrenadante (extracto) obtenido una alícuota de 20  $\mu$ l el cual se combinó con 1 ml del cromógeno (metmioglobina + ABTS<sup>MR</sup>), la solución obtenida fue llevada a un espectrofotómetro (Jenway, modelo 6320D) para determinar la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. Las lecturas de absorbancia se realizaron también en un blanco (agua destilada) y un estándar (Trolox: 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico, 2.03

mM). Después de tres minutos se agregaron tanto a las muestras experimentales como al blanco y al estándar, 200  $\mu$ l de sustrato (peróxido de hidrogeno estabilizado), para leer nuevamente la absorbancia en el espectrofotómetro a 600 nm y obtener las lecturas diferenciales ( $\Delta$ ) de las muestras experimentales, las muestras blanco y estándar ( $\Delta$  = lectura inicial – lectura transcurridos los 3 min). La capacidad antioxidante total equivalente a Trolox (mM) fue determinada mediante la fórmula siguiente:

$$\text{ANT} = \frac{(\text{Concentración del estándar})(\Delta \text{ Blanco} - \Delta \text{ Muestra})}{(\Delta \text{ Blanco} - \Delta \text{ Estándar})}$$

**Determinación de la producción de fruta.** Se recolectaron los frutos de diez plantas de cada tratamiento durante cinco cortes, determinando con ello el total de gramos por planta generado entre los 73 y los 105 días después del trasplante. El peso de los frutos se verificó con una balanza analítica digital Explorer Pro.

**Diseño Experimental y análisis estadístico.** El experimento se estableció bajo un diseño de bloques completos al azar con dos repeticiones. Se consideró una planta como la unidad experimental y se manejaron dos plantas por cada evaluación por tratamiento. En cada tratamiento se establecieron un total de 50 plantas.

Para determinar la presencia de diferencias entre las series de datos de las concentraciones de los diferentes compuestos analizados se realizó la prueba de Wilcoxon (Wilcoxon Matched Pairs Test, Statistica for Windows versión 6.0). De igual forma a las series de datos de las concentraciones se les realizó la prueba Cross-Correlation Function (Statistica for Windows versión 6.0) para determinar correlación entre los niveles de AS y CAT. Se llevó a cabo la comparación de los resultados en cada muestro usando un análisis de varianza y una prueba múltiple de comparación de medias de Tukey (P=0.05) (Statistical Analysis System para Windows versión 9.0).

## Resultados y Discusión

**Cambio en la concentración de ácido salicílico (AS) en las hojas.** La prueba de Wilcoxon, determinó diferencia estadística significativa entre las series de datos de los tratamientos (Figura 1). Los tratamientos con aplicación foliar de AS mostraron las mayores concentraciones de este compuesto, sin embargo no hubo tal diferencia con y sin el NaCl. Los tratamientos sin AS produjeron los valores más bajos de concentración de este compuesto, de nuevo sin efecto alguno del NaCl. Resultados análogos fueron reportados por Szalai *et al.* (2005) y Szalai y Janda (2009) quienes aplicaron 50 y 100 mM de NaCl en plántulas de maíz (*Zea mays* L.) sin encontrar incremento en la concentración de AS foliar. Lo mismo fue reportado por Hussain *et al.* (2011) en violetas (*Viola odorata* L.) al aplicar 50 mM de NaCl sin encontrar incremento en la concentración de AS foliar, así como por Iqbal y Ahsraf (2006) quienes no encontraron cambio significativo en la concentración de AS en semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.) germinadas en un medio de cultivo con 150 mM de NaCl (conductividad eléctrica de 15 dS m<sup>-1</sup>). Otros autores como Shawada *et al.* (2010) reportaron aumento en la concentración de AS a las 24 h de someter plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) a 120 mM de NaCl. Es posible que la detección de cambios significativos en la concentración de AS dependa por una parte del tiempo del muestreo y la concentración de NaCl y, por otro lado de la condición particular de desarrollo de la planta y la especie de que se trate (Yokoi *et al.*, 2002).

Al comparar los diferentes tiempos de muestreo la concentración de AS en el tejido foliar mostró diferencias entre tratamientos a las 24 h después de la primera aplicación, a las 12 y 24 h después de la segunda aplicación, y a las 12, 24 y 48 h después de la tercera aplicación (Figura 1), siendo los tratamientos donde se aplicó AS foliar los que presentaron las concentraciones más elevadas de AS en el tejido en los momentos mencionados, para en adelante presentar disminución en la concentración e igualar el contenido de AS foliar de las plantas control (a las 48 h después de la primera y segunda aplicación y a las 144 h después de la tercera aplicación). Aunque los tratamientos con aplicación de AS con y sin aplicación de NaCl presentaron un comportamiento similar en todos los muestreos, fue posible verificar diferencias significativas entre los tratamientos mencionados a las 24 h después de la primera aplicación y a las 12, 24 y 48 h después de la tercera aplicación, con los valores de concentración de AS más elevados en



donde se aplicó NaCl (Figura 1). Una respuesta análoga fue descrita por Esmailzadeh *et al.* (2008) al combinar la aplicación de AS (400  $\mu\text{M}$ ) en hojas de tomate con la infección con *Alternaria alternata*, encontrando valores menores al aplicar por separado el AS y el patógeno. El incremento significativo de la concentración de AS en las hojas sujetas a estrés salino donde se aplicó AS foliar (AS foliar + 100 mM NaCl en sustrato) pudiera atribuirse a la conocida función del AS como compuesto señalizador del estrés y a la inducción de respuestas de resistencia (Yalpani *et al.*, 1993; Tari *et al.*, 2006; Iwai *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007; Hussain *et al.*, 2007). Por su parte las plantas del tratamiento testigo no presentaron variación significativa en la concentración de AS foliar a lo largo del estudio, comportamiento diferente al reportado en *Arabidopsis thaliana*, con cambios en la concentración de AS foliar en cada etapa fenológica (Abreu and Munne, 2009).

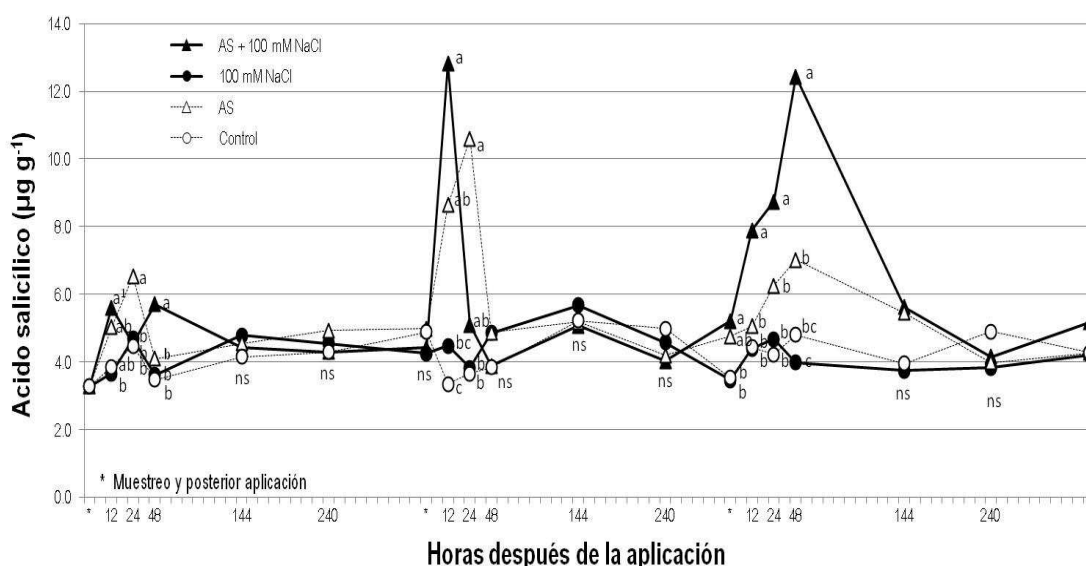


Figura 1. Dinámica de la concentración de ácido salicílico en hojas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) como respuesta a la aplicación exógena del mismo (AS) a  $10^{-4}$  M ( $0.0138 \text{ g L}^{-1}$ ) cada 15 días bajo dos condiciones de desarrollo (0 y 100 mM de NaCl en el medio de cultivo). <sup>1</sup>Los promedios señalados con la misma literal son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

Al revisar el incremento y posterior disminución del AS después de la aplicación foliar, se encuentra parecido con la respuesta frente a otros tipos de estrés. La misma tendencia fue reportada por He *et al.* (2007) en hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) al aplicar el ácaro *Tetranychus urticae* Koch y por Ogawa *et al.* (2010) en hojas de *Arabidopsis thaliana* con la aplicación de estímulos mecánicos. Dichos

autores encontraron también los picos máximos de concentración a las 24 h después del estímulo, para posteriormente iniciar una disminución en la concentración, siendo el tiempo de máxima acumulación similar a lo encontrado en el presente estudio. La caída en la cantidad detectable de AS (posterior al pico de concentración) puede obedecer a la transformación del AS en formas conjugadas (Klämbt, 1962; He *et al.*, 2007) principalmente como glucósidos de salicílico y benzóico (Mustafa *et al.*, 2007; Owaga *et al.*, 2010) o bien formas metiladas o activadas con coenzima A (Wildermuth, 2006). Una vez que el AS pasa a una forma conjugada, se considera una especie química de reserva que puede reconvertirse nuevamente en AS (Wildermuth, 2006). Este fenómeno fue descrito por Panina *et al.* (2005) quienes al determinar las concentraciones de AS y sus conjugados en discos de papa infectados con *Phytophthora infestans* observaron la transformación de los conjugados de AS en AS libre en un lapso de 48 horas.

Las concentraciones de AS foliar determinadas en el presente estudio se asemejan a las reportadas por He *et al.* (2007) en hojas de frijol a las 24 h posteriores a la infestación por el acaro *Tetranychus urticae* Koch, con un valor máximo de AS de 12  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso fresco. Shulaev *et al.* (1995) en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) infectadas con VMT encontraron concentraciones máximas de AS equivalentes a 10  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso fresco, aumentando esta concentración en los tejidos cercanos al sitio de infección transcurridas 144 h después del inicio de la misma. Por otra parte, Barbaus-Larson y Jacobsen (2007) al aplicar 50 ppm de probenazole en remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) e Iwai *et al.* (2007) aplicando el mismo compuesto sobre plantas de arroz (*Oryza sativa* L.), determinaron la máxima concentración de AS en 3.1 y 7.3  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso fresco, respectivamente. Es claro que los valores de concentración endógena de AS dependerán del tipo de especie manejada (Chandra *et al.*, 2007), la concentración o manejo del AS aplicado (Cag *et al.*, 2009) y las condiciones bajo las cuales se lleve a cabo cada ensayo, manteniéndose como constante la aparente transformación de una parte del AS libre hacia formas conjugadas, incluso si esta respuesta se encuentra acompañada de concentraciones muy altas de AS y/o tiempos de respuesta tan cortos como 30 minutos (Norman *et al.*, 2004). Inclusive los valores de concentración más bajos también presentan picos máximos y posteriores caídas, lo que hace suponer la incorporación del AS a moléculas conjugadas, tal y como lo encontraron Park *et al.* (2007) y Yalpani *et al.* (1991) quienes reportaron concentraciones en el orden de 0.35  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso fresco en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) a las 144 h después de infectar las plantas con VMT.

**Actividad catalasa (CAT).** La prueba de Wilcoxon determinó diferencia estadística significativa entre las series de datos de la actividad CAT para los diferentes tratamientos (Figura 2). Los dos tratamientos en donde se aplicó NaCl mostraron los valores más altos de actividad CAT en la serie de datos, sin importar si se aplicó o no el AS. Los dos tratamientos sin aplicación de NaCl fueron menores a

los anteriores pero no diferentes entre sí, lo que parece indicar un efecto más importante del NaCl sobre la CAT en comparación con el AS. Por otro lado, puede observarse en la misma Figura 2 que al comparar los diferentes tiempos de muestreo en todos los casos los picos más altos de actividad CAT corresponden al tratamiento en donde se aplicó el NaCl y el AS. Este resultado de aparente sinergia entre el NaCl y el AS para inducir actividad CAT coincide con lo reportado en plantas de maíz (El-Khallal *et al.*, 2009), en *Vicia faba* (Azooz, 2009), en trigo (Erdal *et al.*, 2011) y en *Solanum bulbocastanum* (Daneshmand *et al.*, 2009). Es posible que este efecto del AS foliar sobre la actividad de la CAT tenga relación con la interacción del AS y las especies reactivas del oxígeno (ROS) formadas durante el estrés oxidativo inducido por el NaCl (Apel and Hirt, 2004; Miller *et al.*, 2010). Para verificar lo anterior se llevó a cabo una cross correlation between two time series, la cual arrojó correlación positiva y significativa ( $R=0.571$ ) entre las dinámicas de las series de datos de concentración de AS foliar y actividad CAT para el tratamiento de aplicación de NaCl y AS. Para el resto de los tratamientos la correlación no fue significativa. Este resultado puede indicar que la interacción de las aplicaciones de AS y NaCl modifica el balance redox al estimular la formación de ROS y  $H_2O_2$  que a su vez estimula la acumulación de enzimas antioxidantes como la CAT (Mittler, 2002; Kawano, 2003; Kato *et al.*, 2004; Gupta and Sharma, 2009).

Al revisar el incremento y posterior disminución de la actividad CAT después de la aplicación foliar de AS se encontró similitud a lo reportado en otros cultivos como en la papa (Sinkevick *et al.*, 2009) y *Anthurium andraeanum* (Promyou *et al.*, 2012) sometidos a baja temperatura. La aplicación de biorreguladores en plántulas de sorgo produjo una respuesta análoga (Olteanu *et al.*, 2009), así como la exposición a  $500 \mu\text{M}$  de Pb en arroz (Verma y Dubey, 2003). Dichos incrementos en la actividad CAT se supone tienen relación con el aumento en la concentración de radicales libres o de compuestos derivados de los mismos como el  $H_2O_2$  (Srivalli *et al.*, 2003). Por otra parte, Feierabend y Dehne (1996) indican que los descensos posteriores a los picos de máxima actividad de CAT pueden resultar de la presencia de una mayor cantidad de moléculas antioxidantes como la ascorbato peroxidasa, tal como fue observado en maíz por El-Khallal *et al.* (2009), o bien a la actividad de proteasas que degradan la CAT y son inducidas por niveles altos o tiempos largos de exposición a algún factor de estrés tal como lo reportan Noreen and Ashraf (2009) en plantas de chícharo así como Esfandiari *et al.* (2007) y Hameed *et al.* (2008) en trigo al exponer las plantas a NaCl. Dicho comportamiento de la CAT también es inducido por otros factores ambientales como  $500$  y  $1000 \mu\text{M}$  de Pb en el sustrato (Verma and Dubey, 2003) y la presencia de metales pesados (Kachout *et al.*, 2010). Inclusive se sabe que la combinación de varios factores de estrés puede provocar una relación inversa entre el contenido endógeno de AS y la actividad de la CAT (Shim *et al.*, 2003).

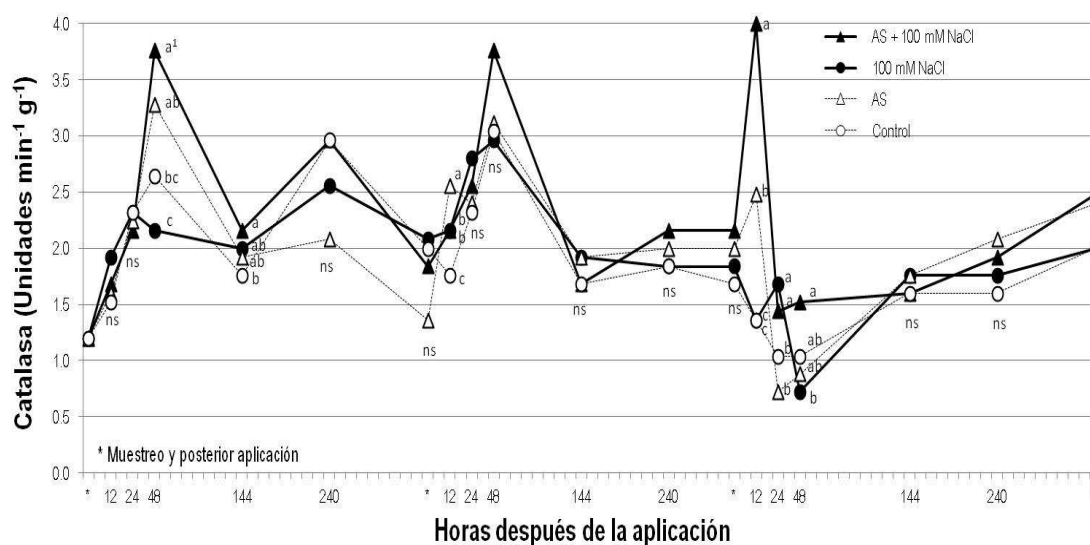


Figura 2. Dinámica de la actividad enzimática de la catalasa (CAT) en hojas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) como respuesta a la aplicación exógena de ácido salicílico (AS) a  $10^{-4}$  M ( $0.0138 \text{ g L}^{-1}$ ) cada 15 días bajo dos condiciones de desarrollo (0 y 100 mM de NaCl en el medio de cultivo). Unidad de CAT se define como la cantidad de enzima que descompone  $1 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . <sup>1</sup>Los promedios señalados con la misma literal son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

**Capacidad Antioxidante Total (TAC).** La prueba de Wilcoxon indicó diferencia estadística significativa entre las series de datos de los tratamientos (Figura 3). Los tratamientos con aplicación foliar de AS mostraron los mayores niveles de TAC, sin mostrar diferencia al aplicar o no aplicar el NaCl. Los tratamientos en donde no se aplicó el AS mostraron los valores más bajos de TAC, de nuevo sin efecto alguno del NaCl. Este incremento de la capacidad antioxidante por aplicación del AS concuerda con lo reportado por Ramírez *et al.* (2006) al aplicar AS en plantas de acelga (*Beta vulgaris* L.) y por Khandaker *et al.* (2011) al aplicarlo en amaranto (*Amaranthus tricolor* L.). Esta respuesta se atribuye a la capacidad del AS para modificar el balance redox celular activando algunas de las respuestas asociadas al choque oxidativo, lo cual a su vez desencadena la acumulación de compuestos antioxidantes (Álvarez, 2000). La capacidad antioxidante total del extracto foliar obtenida en los diferentes muestreos presentó valores superiores transcurridas 144 h en comparación con lo observado a las 48 h después de una aspersión (Figura 3). Este comportamiento resulta similar a lo encontrado en plantas de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) por Wei *et al.* (2011) al determinar el pico de máxima TAC entre 144 y 216 h después de la una aspersión, disminuyendo más adelante.

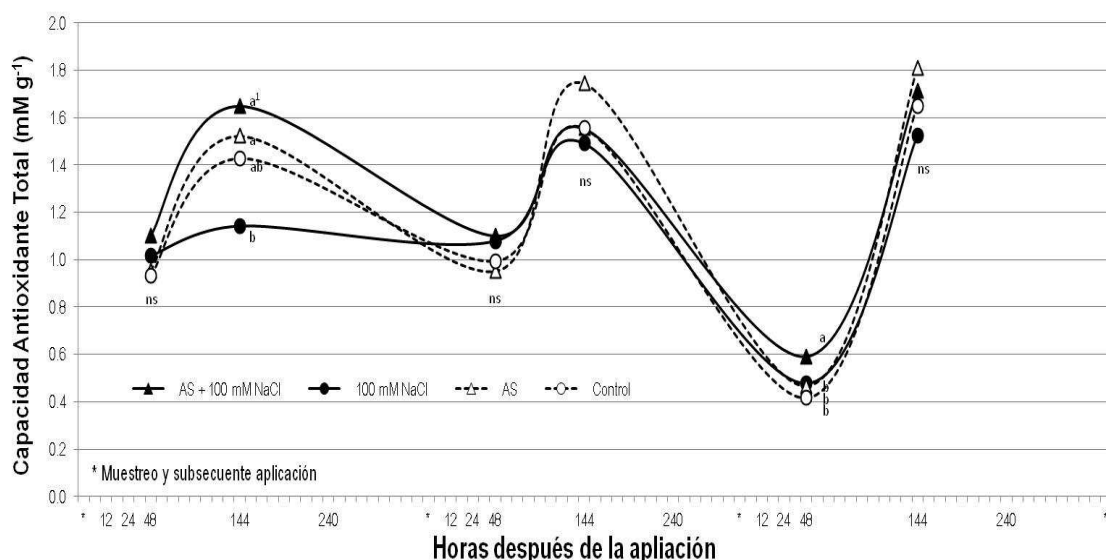


Figura 3. Dinámica de la concentración de Antioxidantes totales (ANT) en hojas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) como respuesta a la aplicación exógena de ácido salicílico (AS) a  $10^{-4}$  M ( $0.0138 \text{ g L}^{-1}$ ) cada 15 días bajo dos condiciones de desarrollo (0 y 100 mM de NaCl en el medio de cultivo). <sup>1</sup>Los promedios señalados con la misma literal son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

**Producción de Fruto.** La producción de fruto obtenido de los cinco cortes no presentó diferencia entre el tratamiento control y los tratamientos con aspersión foliar de AS (Figura 4). Solamente el tratamiento en donde se aplicó NaCl y en donde se aplicó AS mostraron una diferencia significativa. Diferentes autores reportaron aumentos en la producción de fruta (Larquesaavedra *et al.*, 2007; Yildirim and Dursan, 2008; Karlidag *et al.*, 2009; Mady, 2009) al aplicar el AS, sin embargo, el AS es un compuesto inductor de gran cantidad de respuestas metabólicas, generalmente dirigidas al ajuste del balance redox en el aparato fotosintético cuando se presentan situaciones de estrés ambiental (Hayat *et al.*, 2010). En el caso del estrés inducido por la salinidad los ajustes se refieren sobre todo a los compuestos antioxidantes para aliviar el estrés oxidativo, no resultando siempre el ajuste metabólico en un aumento en la producción de fruta del cultivo (Stevens *et al.*, 2006; Joseph *et al.*, 2010).

Por otra parte la aplicación de NaCl no produjo un descenso significativo en la producción de fruta con respecto al tratamiento control, a pesar de considerarse el cv. Rio Grande como susceptible a la salinidad (Zid and Ben-Salh, 2005). Otros autores, usando cultivares diferentes al manejado en el presente estudio, reportaron disminución en la producción de fruta de tomate al

aplicar NaCl en concentraciones inclusive menores a las aquí usadas (López and Satti, 1996; Stamatakis *et al.*, 2003; Satti and López, 2008; Magan *et al.* 2008).

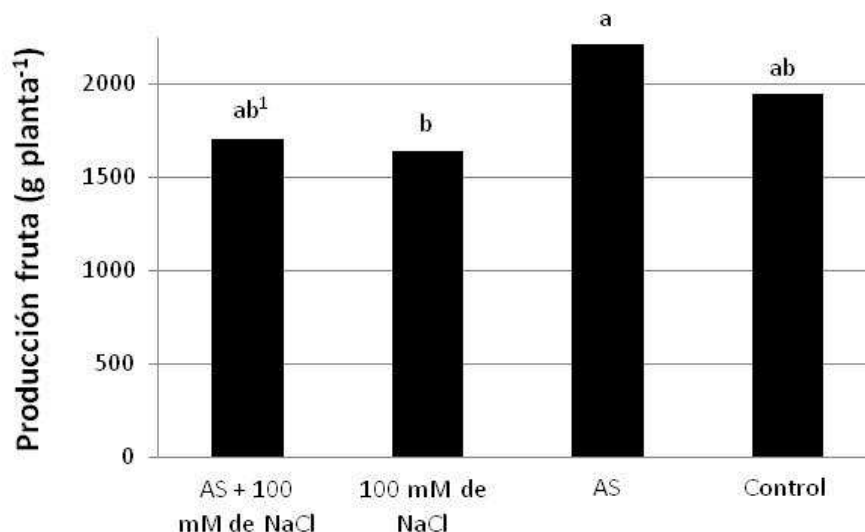


Figura 4. Peso de los frutos (g/planta) cosechados del día 73 al 105 después del trasplante en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) sometidas a los diferentes tratamientos de aplicación exógena de ácido salicílico (AS) a  $10^{-4}$  M (0.0138 g L<sup>-1</sup>) y NaCl 100 mM. <sup>1</sup>Los promedios señalados con la misma literal son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

## Conclusiones

- La aplicación de ácido salicílico (AS) de forma foliar, induce una mayor concentración del compuesto en el tejido foliar de tomate con un efecto residual de 24 a 144 h.
- La aplicación AS de forma foliar aumentó la capacidad antioxidante total (TAC) del tejido foliar sin modificar el peso de fruto.
- La aplicación de 100 mM de NaCl en la solución nutritiva aumentó la actividad catalasa, pero no modificó la capacidad antioxidante total, la concentración de SA foliar ni el peso de fruto.
- La aplicación de AS de forma foliar a las plantas bajo aplicación de NaCl incrementó la actividad catalasa y la capacidad antioxidante total en el tejido foliar.

## Referencias

- Abreu, M. and Munne-Bosch, S. 2009. **Salicylic ácido deficiency NahG transgenic lines and sid2 mutants increases seed yield in the annual plant Arabidopsis thaliana.** J Exp. Bot., 60 (4): 1261-1271.
- Ahmed, B., Farouk, K., Arafet, M., Hajer, M. and Ezzeddine, Z. 2009. **Salicylic acid induced change in tomato growth under salinity.** The proceeding of the international plant nutrition colloquium XVI, Department of plant science, UC Davis. USA.
- Alvarez, M. 2000. **Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance.** Plant Mol. Biol. 44: 429-442.
- Arfan, M. 2009. **Exogenous application of salicylic acid through rooting medium modulates ion accumulation and antioxidant activity in spring wheat under salt stress.** International Journal of Agriculture and Biology, 11 (4): 437-442.
- Ashraf, M. and Baghban, B. 2010. **Activation of phenylalanine ammonia lyase as a key component of the antioxidative system of salt challenged maize leaves.** Braz. J. Plant Physiology, 22 (4): 217-223.
- Ashraf, M., Akram, N. A., Arteca, R. N. and Foolad, M. R. 2010. **'The Physiological, Biochemical and Molecular Roles of Brassinosteroids and Salicylic Acid in Plant Processes and Salt Tolerance'**, Critical Reviews in Plant Sciences, 29 (3): 162-190.
- Azooz, M. 2009. **Salt stress mitigation by seed priming with salicylic acid in two faba bean genotypes differing in salt tolerance.** International Journal of Agriculture and Biology, 11:343-350.
- Azooz, M., and Youseef, M. 2010. **Evaluation of Heat Shock and Salicylic acid treatments as inducers of drought stress tolerance in wheat.** American Journal of Plant Physiology, 5 (2): 56-70.
- Barba-Espin, G., Clemente-Moreno, M., Garcia-Legaz, M. and Díaz-Vivancos, P. 2011. **Salicylic acid negatively affects the response to salt stress in pea plants.** Plant Biology, 13 (6): 909-917.

- Barbaus-Larson, R. and Jacobsen, B. 2007. **Biocontrol elicited system resistance in sugarbeet is salicylic acid independent and NPR1 dependent.** Journal of sugarbeet research, 44:1-2.
- Bettaieb, T., Mahmoud, M., Ruiz de Galarreta, J. and Jardin P. 2007. **Relation between low temperatura stress and catalase activity in gladiolus somaclones (*Gladiolus grandiflorus* Hort.).** Scientia Horticulturae, 113 (1): 49-51.
- Daneshmand, F., Javad-Arvin, M. and Monouchehri-Kalantari, K. 2009. **Effect of Acetylsalicylic acid (Aspirin) on salt and osmotic stress tolerance in *Solanum bulbocastarum* in vitro: enzymatic antioxidants.** American-Eurasian J. Agric. And Environ. Sci., 6 (1): 92-99.
- Daykan, D., Yagmur, M. and Okut, N. 2007. **Effect of de salicylic acid on the growth and some physiological charactrs in salt stressed wheat (*Triticum aestivum* L.).** Tarin bilimleri dergisi, 13(2): 114-119.
- Dolatabadian, A., Mohammad, S. A., Sanavy, M., and Sharif, M. 2008. **Effect of salicylic acid and salt on wheat seed germination.** Acta Agric. Scandinavica Section B. Soil Plant Sci., 1-9.
- El-Khallal, S., Hathout, T., Ahsour, A. and Kerrit, A. 2009. **Brassinolide and Salicylic acid induced antioxidant enzymes, Hormonal balance and Protein profile of maize plants grown under salt stress.** Research Journal of Agriculture and Biological Science, 5(4): 391-402.
- Endreva, A. 2004. **A novel strategy for plant protection: induce resistance.** Journal of Cell and Molecular Biology, 3: 61-69.
- Enyedi, A., Nalpai, N., Silverman, P. and Raskin, I. 1992. **Localization, conjugation, and function of salicylic acid on tobacco during hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:2480-2484.
- Esfandiari, E., Shekari, F., Shekari, F. and Esfandiari, M. 2007. **The effects of salt stress on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation on the wheat seedling.** Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj., 35 (1): 48-56.
- Esmailzadeth, M., Soleimani, M. and Rouhani, H. 2008. **Exogenous application of salicylic acid for induced systemic acquired resistance against tomato steam canker disease.** Journal of Biological Science, 8 (6): 1039-1044.



- Feierabend, J. and Dehne, S. 1996. **Fate of the prophylin cofactors during the light-dependent turnover of catalase and the photosystem II reaction-center protein D1 in mature rye leaves.** *Planta*, 1: 413-422.
- Forcat, S., Bennett, N., Mansfield, J. and Grand, M. 2008. **A rapid and robust method for simultaneously measuring change in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress.** *Plant Methods*, 4: 16. doi:10.1186/1746-4811-4-16
- Gemes, K., Poor, P., Sulyok, Z., Szepesi, A., Szabo, M. and Tari, I. 2008. **Role of salicylic acid pre-treatment on the photosynthetic performance of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Rio Fuego) under salt stress.** *Acta Biologica Szegediensis*, 52(1): 161-162.
- Genoud, T., Bachala, A., Chua, N. and Metraux, J. 2002. **Phytohormone signaling modulates the salicylic acid perspective pathway in *Arabidopsis*.** *Plant Journal*, 31 (1): 87-95.
- Gharib, F. 2007. **Effect of salicylic acid on growth, metabolic activities and oil content of Basil and Marjoram.** *International Journal of Agricultural and Biology*, 9 (2): 294-301.
- Girling, R., Madison, R., Hassall, M., Poppy, G., and Turner, J. 2008. **Investigation into plant biochemical wound-response pathways involved in the production of aphid-induced plant volatiles.** *Journal of Experimental Botany*, 59 (11):3077-3085.
- Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Bagsi, E. and Cicek, N. 2007. **Salicylic acid induces change in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) growth under salinity.** *Journal of Plant Physiology*, 164 (6): 728-736.
- Hameed, A., Naseer, S., Iqbal, T., Syed, H. and Haq, M. 2008. **Effects of NaCl salinity on seedling growth, senescence, catalase and protease activities in two wheat genotypes differing in salt tolerance.** *Pak. J. Bot.*, 40 (3): 1043-1051.
- Hayat, Q., S. Hayat, M. Irfan, A. Ahmad. 2010. **Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review.** *Environ. Exp. Bot.* 68: 14-25.
- He, W., Li, H., Li, X., Li, M. Chen, Y. 2007. ***Tetranychus urticae* Koch induced accumulation of salicylic acid in frijole leaves.** *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88 (1): 78-81.

- Herrera-Santoyo, J., Lopez-Delgado, H. and Mora-Herrera, E. 2007. **Stress in callus of *Hippocratea excelsa*: catalase activity, hydrogen peroxide and canophyllol accumulation.** *Interciencia*, 32 (4): 235-256.
- Hussain, M., Balbaa, L. and Gaballah, M. 2007. **Salicylic acid and salinity effects on growth of maize plants.** *Research Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 3 (4): 321-328.
- Hussain, M., Nawaz, K., Majeed, A., Ilyas, U., Lin, F., Ali, K. and Nizar, M. 2011. **Role of exogenous salicylic acid applications for salt tolerance in violet.** *Sarhad J. Agric.*, 27 (2): 151-175.
- Hussain, M., Nawaz, K., Majeed, A., Ilyas, U., Lin, F., Ali, K., Farrukh-Nissar, M. 2011. **Role of exogenous salicylic acid application for salt tolerance in violet.** *Sarhad J. Agric.*, 27 (2): 171-175.
- Idrees, M., Naeem, M., Aftab, T., Khan-Masroor, M. Moinuddin. 2011. **Salicylic acid mitigates salinity stress by improving antioxidant defence system and enhances vincristine and vinblastine alkaloids production in periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don].** *Acta Physiologiae Plantarum*, 33 (3): 987-999.
- Iqbal, M. and Ahsraf, M. 2006. **Wheat seed priming in relation to salt tolerance: growth, yield and levels of free salicylic acid and polyamides.** *Ann. Bot. Fennici*, 43: 250-259.
- Iwai, T., Seo, S., Mitsuhashi, I. and Ohashi, K. 2007. **Probenazole induced accumulation of salicylic acid confers resistance to *Magnaporthe grisea* in rice.** *Plant Cell Physiology*, 48 (7): 915-924.
- Jiang, X., Song, Y., Xi, X., Guo, B., Ma, K., Wang, Z., Li, B., Zhang, D., An, X. and Zhang, Z. 2011. **Physiological and biochemical responses to low temperature stress in hybrid clones of *Populus ussuriensis* Kom. x *P. deltoides* Bartr.** *African Journal of Biotechnology*, 10 (82): 19011-19024.
- Joseph, B., D. Jini, S. Sujatha. 2010. **Insight into role of exogenous salicylic acid on plants growth under salt environment.** *Asian J. Crop Sci.* 2:226-235.
- Kachout, S., Mansoura, A., Leclerc, J., Mechergui, R., Rejeb, M. and Ouergui, Z. 2010. **Effects of heavy metals on antioxidant activities of: *Atriplex hortensis* and *A. rosea*.** *EJEAFche*, 9 (3): 444-457.

- Karlıdag, H., Yildirim, E., and Turan, M. 2009. **Salicylic acid ameliorates the adverse effect of salt stress on strawberry**. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.), 66 (2): 180-187.
- Kaydan, D. Yagmur, M. and Okut, N. 2006. **Effects of salicylic acid on the growth and some physiological characters in salt stressed wheat (*Triticum aestivum* L.)**. Tirim Bilimleri Dergisi, 13 (2): 114-119.
- Khalili, M., Hasanloo, T., Kasemi, S. and Sepehrifar R. 2010. **Effect of salicylic acid on antioxidant activity in Milk Thistle haired root cultures**. Journal of Medicinal Plants, 35(9): 51-61.
- Khan, N., Syeed, S., Masood, N., Nazar, R., and Iqbal, N. 2010. **Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidative metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress**. International Journal of Plant Biology, 1 (1).
- Khandaker, L., Masun-Akond, A. and Oba, S. 2011. **Foliar application of salicylic acid improved the growth, yield and leaf's bioactive compound in red amaranth (*Amaranthus tricolor* L.)**. Vegetable Crops Research Bulletin, 74: 77-86.
- Khelifa, S., M'Hamdi, M., Rejeb, H., Belbahri, L. and Souayeh, N. 2011. **Relation between catalase activity, salt stress and urban environment in *Citrus aurantium* L.** Journal of Agriculture and Forestry, 3(6): 186-189.
- Klämbt, H. 1962. **Conversion in plants of benzoic acid to salicylic acid and its  $\beta$ d-glucoside**. Nature. 196: 491.
- Klessing, D., Durner, J., Noad, R., Navarrete, D., Wendehenme, D., Kumar, D., Ma Zhou, J., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E. and Silva, H. 2000. **Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense**. PNAS, 97 (16): 8849-8855.
- Larque-Saavedra, A., Martin-Mex, R., Nexticapan-Garcez, A., Vergara-Yoisura, S., Gutierrez-Rendon, M. 2010. **Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill)**. Revista Chapingo Serie Horticultura, 16 (3): 183-187.
- López, M. and Stti, S. 1996. **Calcium and potassium enhanced growth and yield of tomato under sodium chloride stress**. Plant Science, 114 (1): 19-27.
- Magan, J., Gallardo, M., Thompson, R. and Lorenzo, P. **Effects on salinity on fruit yield of tomato grown in soil-less culture in greenhouses in Mediterranean climatic conditions**. Agricultural Water Management, 95 (9): 1041-1055.

- Magbanua, Z., De Moraes, C., Brooks, T., Williams, W. and Luthe, D. 2007. **Is catalase activity one of the factor associated with maize resistance to *Aspergillus falvus*?** MPMI, 20 (6): 697-706.
- Mahdavian, K., kalantari, M. and Ghorbanli. 2007. **The effect of different concentration of salicylic acid on protective enzyme activities of pepper (*Capsicum annum* L.) plants.** Pakistan Journal of Biological Sciences, 10 (18): 3162-3165.
- Malamy, J., Henning, J. and Klessig, D. 1992. **Temperature-dependent induction of salicylic acid and its conjugates during the resistance response to tobacco mosaic virus infection.** The Plant Cell, 4: 359-366.
- Masia, A. 1998. **Superoxide dismutase and catalase activities in Apple fruit during ripening and postharvest and with special reference to ethylene.** Physiologia Plantarum, 104 (4): 668-672.
- Mateo, A., Funck, D., Mühlenbock, P., Kular, B., Mullineaux, P. and Karpinski, S. 2006. **Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis.** Journal of Experimental Botany, 57 (8): 1795-1807.
- Miller, N., Rice-Evans, C., Davies, M., Gopinathan, V. and Milner, A. 1993. **A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitor the antioxidant status in premature neonates.** Clinical Science, 84: 407-412.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. and Mittler, R. 2010. **Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stress.** Plant, Cell and Environment, 33: 453-467.
- Mustafa, N., Kin, H., Choi, Y. and Vepoorte, R. 2009. **Metabolic changes in salicylic acid-elicited *Catharanthus roseus* cell suspension cultures monitored by NMR-based metabolic.** Biotechnol Lett, 31:1967–1974.
- Noreen, S. and Ashraf, M. 2008. **Alleviation of adverse effects of salt stress on sunflower (*Helianthus annuus* L.) by exogenous application of salicylic acid: growth and photosynthesis.** J. Bot., 40(4): 1657-1663.
- Noreen, S. and Ashraf, M. 2009. **Assessment of variation in antioxidative defense system in salt treated pea (*Pisum sativum*) and its putative use as salinity tolerant markets.** Journal of Plant Physiology, doi:10.1016/j.jplph.2009.05.005

- Noreen, S., Ashraf, M., Hussain, M., and Jamil, A. 2009. **Exogenous application of salicylic acid enhances antioxidative capacity in salt stressed sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants.** Pakistan Journal Botanic, 41 (1): 473-479.
- Norman, C., Howell, K., Millar, A., Whelan, J. and Day, D. 2004. **Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport.** Plant Physiology, 34: 492-501.
- Ogawa, T., Ara, T., Aoki, K., Suzuki, H., and Shibata, D. 2010. **Transient increase in salicylic acid and its glucose conjugates after wounding in Arabidopsis leaves.** Plant Biotechnology, 27: 205–209.
- Olteanu, Z., Oprica, L., Truta, E. and Zamfirache, M. 2010. **Response of barley seedling to oxidative stress generated by treatments with growth hormones.** Analele Științifice ale Universității, Alexandru Ioan Cuza, TOM X, pp., 29-36.
- Ortega-Ortiz, H., Benavides-Mendoza, A., Mendoza-Villareal, R., Ramírez-Rodríguez, H. and De Alba, K. 2007. **Enzymatic activity on tomato fruits as a response to chemical elicitors.** J. Mex. Chem. Soc., 51 (3): 141-144.
- Park, S., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S. and Klessig, D. 2007. **Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance.** Science, 318: 313-316.
- Poor, P., Gemes, K., Horvath, F., Szepesi, A., Simon, M. and Tari, I. 2010. **Salicylic acid treatment via the rooting medium interferes with estomatal response, CO<sub>2</sub> fixation rate and carbohydrate metabolism in tomato and decreases harmful effects of subsequent salt stress.** Plant Biology, DOI: 10.1111/j.1438-8677.2010.00344.x.
- Purcarea, C., and Cachita-Cosma, D. 2010. **Studies regarding the effects of salicylic acid in maize (*Zea mays* L.) seedling under salt stress.** Studia Universitat, Seria tiin ele Vie ii., 20 (1): 63-68.
- Ramírez, H., Rancaño-Arrijoa, J., Benavides-Mendoza, A., Mendoza-Villareal, R., Patron-Corral, E. 2006. **Influencia de promotores de oxidación controlada en hortalizas y su relación con antioxidantes.** Revista Chapingo (serie horticultura), 12 (2): 189-195.
- Salehi, S., Khajehzadeh, A. and Khorsandi, F. 2011. **Growth of tomato as affected by foliar application of salicylic acid and salinity.** American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 11 (4): 564-567.

- Satti, S. and Lopez, M. 2008. **Effects of increase potassium level for alleviation sodium chloride stress on the growth and yield of tomato**. Communication on Soil Science and Plant Analysis, 25: 15-16.
- Shahrtash, M., Mohsenzadeh, S. and Mohabatkar, H. 2011. **Salicylic acid alleviates paraquat oxidative damage in maize seedling**. Asian J. Exp. Biol. Sci., 2 (3): 377-382.
- Shim, I., Momose, Y., Yamamoto, A., Kim, DW. And Usui, K. 2003. **Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants**. Plant Growth Regulators, 39 (3): 285-292.
- Shulaev, V., León, J. and Raskin, I. 1995. **Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in Tobacco?**. The Plant Cell, 7: 1691-1701.
- Soto, P., Gaete, H. e Hidalgo, M. 2011. **Assessment of catalase activity, lipid peroxidation, chlorophyll-a, and growth rate in the fresh water green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to copper and zinc**. Lat. Am. J. Aquat. Res., 39 (2): 280-285.
- Srivalli, B., Sharma, G. and Khanna-Chopra, R. 2003. **Antioxidative defense systems in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery**. Physiol. Plant 119, 503–512.
- Steiner, B. 1961. **A universal method for preparing nutrient solution of a certain desired composition**. Plant and Soil, 16(2): 134-154.
- Stevens J., Senaratna, T and Sivasithamparam, K. 2006. **Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): associated changes in gas exchange, water relations and membrane stabilisation**. Plant Growth Regul. 49:77-83.
- Szalai, G., Paldi, E. and Janda, T. 2005. **Effects of salt stress on the endogenous salicylic acid content in maize (*Zea mays* L.) plants**. Acta Biologica Szegediensis, 49 (1-2): 47-48.
- Szalai, G. and Janda, T. 2009. **Effect of salt stress on the salicylic acid synthesis in young maize (*Zea mays* L.) plants**. Journal of Agronomy and Crop Science, 193 (3): 165-171.
- Szepesi, A., Criszar, K., Horvath, E., Horvat, F., Simon, M. and Tari, I. 2009. **Salicylic acid improves acclimation to stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation and increase Na<sup>+</sup> content in leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L.** J. Plant Physiology, 166: 917-928.

- Tari, I., Csiszar, J., Szalai, G., Horvath, F., Pecsvaradi, A., Kiss, G., Szepesi, A., Szabo, M., Erdei, L. 2002. **Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pre-treatment.** *Acta Biologica Szegediensis*, 43 (3-4): 55-56.
- Umebese, C., Olatimilehin, T. and Ogonsusi, T. 2009. **Salicylic acid protects nitrate reductase activity, growth and proline in amaranth and tomato plants during water deficit.** *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4 (3): 224-229.
- Urbani, P., Ranmuno, A., Filosa, R., Pinto, A., Popolo, A., Bianchino, E., Piotto, S., Saturnino, C., De Prisco, R., Nicolaus, B. and Tommonaro, G. 2008. **Antioxidant activity of diphenylpropionamide derivatives: synthesis, biological evaluation and computational analysis.** *Molecules*, 13: 749-761.
- Valero, D., Díaz-Mula, H., Zapata, P., Castillo, S., Guillen, F., Martinez-Romero, D. and Serrano, M. 2011. **Postharvest treatments with salicylic acid, acetylsalicylic acid or oxalic acid delayed ripening and enhance bioactive compound and antioxidant capacity in sweet cherry.** *J. Agric. Food Chem.*, 59 (19): 5483-5489.
- Verma, S. and Dubey, R. 2003. **Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants.** *Plant Science*, 164: 645-655.
- Wildermuth, M., Dewdney, J., Wu, G. and Ausubel, F. 2001. **Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense.** *Nature*, 414: 562-566.
- Xu, X. and Tian, S. 2008. **Salicylic acid alleviated pathogen induced oxidative stress in harvested sweet cherry fruit.** *Postharvest biology and technology*, 49: 379-385.
- Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T., Kleier, D. and Raskin, I. 1991. **Salicylic acid is a systemic signal of pathogenesis related protein in virus infected tobacco.** *The Plant Cell*, 3: 809-818.
- Yalpani, N., León, J., Lawton, M. and Raskin, I. 1993. **Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus inoculated tobacco.** *Plant Physiology*, 103: 315-321.
- Yildirim, E. and Dursan, E. 2009. **Effect of foliar salicylic acid applications on plant growth and yield of tomato under greenhouse condition.** *ISHS Acta Horticulturae* 807. International symposium on strategies toward sustainability of protect cultivation in mild winter climate.

Yokoi, S., Bressan, A. and Hasegawa, M. 2002. Salt stress tolerance on plants. JIRCAS Working Report, 2002: 25-33.

Zhang, Z., Li, Q., Li, Z., Staswick, P., Wang, M., Zhu, Y., and He, Z. 2009a. **Dual regulation role of GH3.5 in Salicylic Acid and Auxin during Arabidopsis-Pseudomonas siringae interaction.** Plant Physiology, 145: 450–464.

Zhang, X., Schmidt, R. and Ervin, E. 2009b. **Impact of salicylic acid on bermudagrass freezing tolerance associated with abscisic acid and antioxidant metabolism.** Research Journal, 11: 893-902.



## V. CONCLUSIONES GENERALES

- El ácido salicílico (AS) aplicado de forma foliar sobre plántulas de tomate incrementó la concentración del compuesto a  $8 \mu\text{g g}^{-1}$  de peso fresco en comparación con el control que solo alcanzó un valor máximo de  $5 \mu\text{g g}^{-1}$ .
- De acuerdo a los resultados obtenidos, las aplicaciones de AS con propósitos agrícolas sobre plántulas de tomate deberán aplicarse en un intervalo de ocho días entre aplicaciones.
- La aplicación de AS de forma foliar en plantas de tomate induce una mayor concentración del compuesto en el tejido foliar de tomate con un efecto residual de 24 hasta 144 h.
- La aplicación AS de forma foliar a plantas de tomate aumentó la capacidad antioxidante total del tejido foliar sin modificar el peso de fruto.
- La aplicación de 100 mM de NaCl en la solución nutritiva aumentó la actividad catalasa, pero no modificó la capacidad antioxidante total, la concentración de SA foliar ni el peso de fruto.
- La aplicación de AS de forma foliar a las plantas bajo aplicación de NaCl al sustrato incrementó la actividad catalasa y la capacidad antioxidante total en el tejido foliar.

## VI. LITERATURA CITADA

- Abreu, M. and Munne-Bosch, S. 2009. **Salicylic ácido deficiency NahG transgenic lines and sid2 mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana***. J Exp. Bot., 60 (4): 1261-1271.
- Alfonso-Prieto, M., Biarnes, X., Vidossich, P. and Rovira, C. 2009. **The molecular mechanism of the catalase reaction**. Journal of the American Chemical Society, 131: 11751–11761.
- Alvarez, M. 2000. **Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance**. Plant Mol. Biol. 44: 429-442.
- Ahmed, B., Farouk, K., Arafet, M., Hajer, M. and Ezzeddine, Z. 2009. **Salicylic acid induced change in tomato growth under salinity**. The proceeding of the international plant nutrition colloquium XVI, Department of plant science, UC Davis. USA.
- Amor, N., Hamed, k., Debez, A., Grignon, C., Abdelly, C. 2005. **Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Chrithmummaritimum* to salinity**. Plant Science, 168 (4): 889-899.
- Angelova, Z., Georgiev, S. and Ross, W. 2006. **Elicitation of plants**. Biotechnology and Biotechnology, 20 (2): 72-86.
- Apel, K. and Hirt, H. 2004. **Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction**. Annual Review of Plant Biology, 55: 373-399.

- Arfan, M. 2009. **Exogenous application of salicylic acid through rooting medium modulates ion accumulation and antioxidant activity in spring wheat under salt stress.** International Journal of Agriculture and Biology, 11 (4): 437-442.
- Ashraf, M. and Baghban, B. 2010. **Activation of phenylalanine ammonia lyase as a key component of the antioxidative system of salt challenged maize leaves.** Braz. J. Plant Physiology, 22 (4): 217-223.
- Ashraf, M., Akram, N. A., Arteca, R. N. and Foolad, M. R. 2010. **'The Physiological, Biochemical and Molecular Roles of Brassinosteroids and Salicylic Acid in Plant Processes and Salt Tolerance'**, Critical Reviews in Plant Sciences, 29 (3): 162-190.
- Azevedo, R., Alas, R., Smith, R. and Lea, P. 1998. **Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley.** Physiol. Plant. 104: 280-292.
- Azpilicueta, C., Benavides, M., Tomaro, M. and Gallego, S. 2007. Mechanism of CATA3 induction by cadmium in sun flower leaves, Plant Physiol. Biochem. 45: 589-595.
- Azooz, M. 2009. **Salt stress mitigation by seed priming with salicylic acid in two faba bean genotypes differing in salt tolerance.** International Journal of Agriculture and Biology, 11:343-350.
- Azooz, M., and Youseef, M. 2010. **Evaluation of Heat Shock and Salicylic acid treatments as inducers of drought stress tolerance in wheat.** American Journal of Plant Physiology, 5 (2): 56-70.

- Bakarat, N. 2011. **Oxidative stress markers and antioxidant potential of wheat treated with phytohormones under salinity stress.** Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 7 (4): 250-267.
- Barba-Espin, G., Clemente-Moreno, M., Garcia-Legaz, M. and Díaz-Vivancos, P. 2011. **Salicylic acid negatively affects the response to salt stress in pea plants.** Plant Biology, 13 (6): 909-917.
- Barbaus-Larson, R. and Jacobsen, B. 2007. **Biocontrol elicited system resistance in sugarbeet is salicylic acid independent and NPR1 dependent.** Journal of sugarbeet research, 44: 1-2.
- Benavides-Mendoza, A. (Compilador). 2002. **Ecofisiología y Bioquímica del Estrés en Plantas.** Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Horticultura, Buenavista, Saltillo, Coah. México. 287 páginas.
- Benavides-Mendoza, A., Salazar-Torres, A., Raírez-Godina, F., Robledo-Torres, V., Ramírez-Rodríguez, H. y Maiti., R. 2004. **Tratamiento de semilla de chile con ácidos salicílico y sulfosalicílico y respuesta de las plántulas al frío.** Terra Latinoamericana, 22: 41-47.
- Bettaieb, T., Mahmoud, M., Ruiz de Galarreta, J. and Jardin P. 2007. **Relation between low temperatura stress and catalase activity in gladiolus somaclones (*Gladiolus grandiflorus* Hort.).** Scientia Horticulturae, 113 (1): 49-51.
- Bishop, G. and Koncz, C. 2002. **Brassinosteroid and plant steroid signaling.** The Plant Cell, s97-s110.

- Brown, L. and Baker, A. 2008. **Shuttles and cycles: transport of proteins into the peroxisome matrix.** *Molecular Membrane Biology* 25: 363–375.
- Browse, J. 2009. **Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone.** *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 183-205.
- Cag, S., Cevair-Oz, G., Sarsag, M. and Gorem-Saglam, N. 2009. **Effects of salicylic acid on pigment, protein content, and peroxidasa activity in excised sunflower cotyledons.** *Pak. J. Bot.*, 41 (5): 2297-2303.
- Candra, A., Anand, A. and Dubey, A. 2007. **Effects of salicylic acid of morphological and biochemical attributes in cowpea.** *Journal of environment biology*, 28 (2): 193-196.
- Chaouch, S., Queval, G., Vanderauwera, S., Mhamdi, A., Vandorpe, M., Langlois-Meurinne, M., Van Breusegem, F., Saindrenan, P. and Noctor, G. 2010. **Peroxisomal hydrogen peroxide is coupled to biotic defense responses by isochorismate synthase1 in a day length-related manner.** *Plant Physiology*, 153 (4): 1692-1705.
- Daneshmand, F., Javad-Arvin, M. and Monouchehri-Kalantari, K. 2009. **Effect of Acetylsalicylic acid (Aspirin) on salt and osmotic stress tolerance in *Solanum bulbocastarum* in vitro: enzymatic antioxidants.** *American-Eurasian J. Agric. And Environ. Sci.*, 6 (1): 92-99.
- Daykan, D., Yagmur, M. and Okut, N. 2007. **Effect of de salicylic acid on the growth and some physiological characters in salt stressed wheat (*Triticum aestivum* L.).** *Tarin bilimleri dergisi*, 13(2): 114-119.

- Deef, H. 2007. **Influence of salicylic acid on stress tolerance during seed germination of *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare*.** Advances in Biological Research, 1 (1-2): 40-48.
- Dolatabadian, A., Mohammad, S. A., Sanavy, M., and Sharif, M. 2008. **Effect of salicylic acid and salt on wheat seed germination.** Acta Agric. Scandinavica Section B. Soil Plant Sci., 1–9.
- Dutilleul, C., Garmier, M., Noctor, G., Mathieu, D., Chetrit, P., Foyer, C. and De Paepe, R. 2003. **Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation.** The Plant Cell, 15: 1212–1226.
- El-Khallal, S., Hathout, T., Ahsour, A. and Kerrit, A. 2009. **Brassinolide and Salicylic acid induced antioxidant enzymes, Hormonal balance and Protein profile of maize plants grown under salt stress.** Research Journal of Agriculture and Biological Science, 5 (4): 391-402.
- El-Shraiy, A. and Hegazi, A. 2009. **Effect of acelsalicylic acid, Indole-3-butiric acid, and giberellic acid on plant growth and yield of pea (*Pisum sativum* L.).** Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 3 (4): 3514-3523.
- El-Tayeb, M. 2005. **Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid.** Plant Growth Regul. 45: 215–224
- Endreva, A. 2004. **A novel strategy for plant protection: induce resistance.** Journal of Cell and Molecular Biology, 3: 61-69.

- Enyedi, A., Nalpai, N., Silverman, P. and Raskin, I. 1992. **Localization, conjugation, and function of salicylic acid on tobacco during hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 2480-2484.
- Erdal, S., Aydim, M., Genisel, M., Taspinar, M., Dumlupinar, R., Kaya, O. and Gorcek, Z. 2011. **Effects of salicylic acid on wheat salt sensitivity.** African Journal of Biotechnology, 10 (30): 5713-5718.
- Esfandiari, E., Shekari, F., Shekari, F. and Esfandiari, M. 2007. **The effects of salt stress on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation on the wheat seedling.** Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj., 35 (1): 48-56.
- Esmailzadeth, M., Soleimani, M. and Rouhani, H. 2008. **Exogenous application of salicylic acid for induced systemic acquired resistance against tomato steam canker disease.** Journal of Biological Science, 8 (6): 1039-1044.
- Fatma, A. 2007. **Effect of salicylic acid on growth, metabolic activities and oil content of Basil and Marjoram.** International Journal of Agricultural and Biology, 9 (2): 294-301.
- Feieraband, J. and Dehne, S. 1996. **Fat of the prophyryin cofactors during the light-dependent turn over of catalase and the photosystem it reaction-center protein D1 mature rye leaves.** Planta, 1: 413-422.
- Forcat, S., Bennett, N., Mansfield, J. and Grand, M. 2008. **A rapid and robust method for simultaneously measuring change in the phytohormones ABA, JA y SA in plants following biotic and abiotic stress.** Plant Methods, 4: 16. doi:10.1186/1746-4811-4-16

- Frugoli, J., Zhong, H., Nuccio, M., McCourt, P., McPeck, M., Thomas, T. and McClung, C. 1996. **Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.** *Plant Physiology*, 112: 327–336.
- Garg, N. and Manchanda, G. 2009. **ROS generation in plants: boon or bane?** *Plant Biosys.*, 143: 80-96.
- Gemes, K., Poor, P., Sulyok, Z., Szepesi, A., Szabo, M. and Tari, I. 2008. **Role of salicylic acid pretreatment on the photosynthetic performance of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) under salt stress.** *Acta Biologica Szegediensis*, 51 (1): 161-162.
- Gemes, K., Poor, P., Sulyok, Z., Szepesi, A., Szabo, M. and Tari, I. 2008. **Role of salicylic acid pre-treatment on the photosynthetic performance of tomato plants (*Lycopersicum sculentum* Mill. cv. Rio Fuego) under salt stress.** *Acta Biologica Szegediensis*, 52 (1): 161-162.
- Genoud, T., Bachala, A., Chua, N. and Metraux, J. 2002. **Phytochrome signaling modulate the salicylic acid perspective pathway in *Arabidopsis*.** *Plant Journal*, 31 (1): 87-95.
- Geun-Choi, D., Hee-Yoo, N., Yeon-Yu, C., De los Reyes, B. and Yun, S. 2004. **The activities of antioxidant enzymes in response to oxidative stresses and hormones in paraquat-tolerant *Rehmannia glutinosa* plants.** *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 37 (5): 618-624
- Gharib, F. 2010. **Effect of Salicylic Acid on the Growth, Metabolic Activities and Oil Content of Basil and Marjoram.** *International Journal of Agriculture and Biology*, 9 (2): 294-301.



- Gill, S. and Tuteja, N. 2010. **Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants.** *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Girling, R., Madison, R., Hassall, M., Poppy, G., and Turner, J. 2008. **Investigation into plant biochemical wound-responses pathways involved in the production of aphid-induced plant volatiles.** *Journal of Experimental Botany*, 59 (11): 3077-3085.
- Guan, T. and Whiteman, M. 2005. **Antioxidant activities of some tropical fruits.** Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, National University of Singapore.
- Gunes, A., Ilal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Bagci, E. and Cicek, N. 2007. **Salicylic acid induced changes in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity.** *Journal of Plant Physiology*, 164 (6): 728-736.
- Gupta, V. and Sharma, S. 2009. **Plants as a natural antioxidant.** *Natural Product Radiance*, 5 (4): 326-334.
- Gutiérrez-Coronado, M., Trejo-López, C. and Larqué-Saavedra, A. 1998. **Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean.** *Plant Physiology and Biochemistry*, 36 (8): 563-565.
- Hameed, A., Naseer, S., Iqbal, T., Syed, H. and Haq, M. 2008. **Effects of NaCl salinity on seedling growth, senescence, catalase and protease activities in two wheat genotypes differing in salt tolerance.** *Pak. J. Bot.*, 40 (3): 1043-1051.

- Hayat, S. and Ahmad, A. 2007. Salicylic acid, a plant hormone. Springer, 410 pp.
- Hayat, Q., S. Hayat, M. Irfan, A. Ahmad. 2010. **Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review**. Environ. Exp. Bot. 68: 14-25.
- He, W., Li, H., Li, X., Li, M. Chen, Y. 2007. ***Tetranychus urticae* Koch induced accumulation of salicylic acid in frijole leaves**. Pesticide Biochemistry and Physiology, 88 (1): 78-81.
- He, Y. and Zhu, Z. J. 2008. **Exogenous salicylic acid alleviates NaCl toxicity and increases antioxidative enzyme activity in *Lycopersicon esculentum***. Biol. Plant, 2: 792–795.
- Herrera-Santoyo, J., López-Delgado, H. and Mora-Herrera, E. 2007. **Stress in callus of *Hippocratea excelsa*: catalase activity, hydrogen peroxide and canophyllol accumulation**. Interciencia, 32 (4): 235-256.
- Hiroko, S., Dea-Wook, K., Katsuishiro, K. and Ie-Sung, S. 2010. **Inabenfide-induced alleviation of salt stress in rice as linked to changes in salicylic acid content and catalase activity**. J. Crop Sci. Biotech. 10: 40-46.
- Holuigue, L., Saula, Blanco, F. and Garreton, V. 2007. **Salicylic acid and reactive oxygen species in the activation of stress defense genes**, pp. 197-246. In S. Hayat and A. Ahmad (ed.) Salicylic acid: a plant hormone. Springer. Dordrecht, The Netherlands.
- Huang, R., Xia, R., Lu, Y., Hu, L. and Xu, Y. 2008. **Effect of pre-harvest salicylic spray treatment on post-harvest antioxidant in the pulp and**

**peel of 'Cara-cara' navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck).** Journal of the Science of Food and Agriculture, 88 (2): 229-236.

Hussain, M., Balbaa, L. and Gaballah, M. 2007. **Salicylic acid and salinity effects on growth of maize plants.** Research Journal of Agricultural and Biological Sciences, 3 (4): 321-328.

Hussain, M., Nawaz, K., Majeed, A., Ilyas, U., Lin, F., Ali, K. and Nizar, M. 2011a. **Role of exogenous salicylic acid applications for salt tolerance in violet.** Sarhad J. Agric., 27 (2): 151-175.

Hussain, M., Nawaz, K., Majeed, A., Ilyas, U., Lin, F., Ali, K., Farrukh-Nissar, M. 2011b. **Role of exogenous salicylic acid application for salt tolerance in violet.** Sarhad J. Agric., 27 (2): 171-175.

Hussain, S., Ali, M., Ahmad, M. and Siddique, K. 2011c. **Polyamines, natural and engineered abiotic and biotic stress in plants.** Biotechnology advances, 29 (3): 300-311.

Idrees, M., Naeem, M., Aftab, T., Khan-Masroor, M. Moinuddin. 2011. **Salicylic acid mitigates salinity stress by improving antioxidant defence system and enhances vincristine and vinblastine alkaloids production in periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don].** Acta Physiologiae Plantarum, 33 (3): 987-999.

Iqbal, M. and Ahsraf, M. 2006. **Wheat seed priming in relation to salt tolerance: growth, yield and levels of free salicylic acid and polyamides.** Ann. Bot. Fennici, 43: 250-259.

- Iwai, T., Seo, S., Mitsuhashi, I. and Ohashi, K. 2007. **Probenazole induced accumulation of salicylic acid confers resistance to *Magnaporthe grisea* adults plants rice**. Plant Cell Physiology, 48 (7): 915-924.
- Janda, T., Szalai, G., Tari, I. and Paldi, E. 1999. **Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants**. Planta, 208: 175-180.
- Jabbarzadeh, Z., Khosh-Khui, M. and Salehi, H. 2009. **The Effect of Foliar-applied Salicylic Acid on Flowering of African Violet**. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 3 (4): 4693-4696.
- Jiang, X., Song, Y., Xi, X., Guo, B., Ma, K., Wang, Z., Li, B., Zhang, D., An, X. and Zhang, Z. 2011. **Physiological and biochemical responses to low temperature stress in hybrid clones of *Populus ussuriensis* Kom. x *P. deltoides* Bartr.** African Journal of Biotechnology, 10 (82): 19011-19024.
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K. and Sharma, S. 2007. **Antioxidative response of *Lemna polyrrhiza* L. to cadmium stress**. Journal of Environmental Biology, 28 (3): 583-589.
- Joseph, B., D. Jini, S. Sujatha. 2010. **Insight into role of exogenous salicylic acid on plants growth under salt environment**. Asian J. Crop Sci. 2: 226-235.
- Kachout, S., Mansoura, A., Leclerc, J., Mechergui, R., Rejeb, M. and Ouergui, Z. 2010. **Effects of heavy metals on antioxidant activities of: *Atriplex hortensis* and *A. rosea***. EJEAFche, 9 (3): 444-457.

- Karlidag, H., Yildirim, E., and Turan, M. 2009. **Salicylic acid ameliorates the adverse effect of salt stress on strawberry.** Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.), 66 (2): 180-187.
- Kato, S., Ueno, T., Fukuzumi, S. and Watanabe, Y. 2004. **Catalase reaction by myoglobin mutants and native catalase. Mechanistic investigation by kinetic isotope effect.** Journal of Biological Chemistry 279: 52376–52381.
- Kaur, N., Reumann, S. and Hu, J. 2009. **Peroxisome biogenesis and function. In: The Arabidopsis Book.** Rockville, USA: American Society of Plant Biologists. URL: <http://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0123>.
- Kawano, T. 2003. **Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction.** Plant Cell Rep., 21: 829-837.
- Kaydan, D. Yagmur, M. and Okut, N. 2007. **Effects of salicylic acid on the growth and some physiological characters in salt stressed wheat (*Triticum aestivum* L.).** Tirim Bilimleri Dergisi, 13 (2): 114-119.
- Khalili, M., Hasanloo, T., Kasemi, S. and Sepehrifar R. 2010. **Effect of salicylic acid on antioxidant activity in Milk Thistle haired root cultures.** Journal of Medicinal Plants, 35(9): 51-61.
- Khan, N., Syeed, S., Masood, N., Nazar, R., and Iqbal, N. 2010. **Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidative metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress.** International Journal of Plant Biology, 1 (1), DOI: 10.4081/pb.2010.e1

- Khandaker, L., Masum-Akond, A. and Oba, S. 2008. **Foliar application of salicylic acid improved the growth, yield and leaves bioactive compounds in red amaranth (*Amaranthus tricolor* L.)**. Vegetable Crops Research Bulletin, 74: 77-86.
- Khandaker, L., Masun-Akond, A. and Oba, S. 2011. **Foliar application of salicylic acid improved the growth, yield and leaf's bioactive compound in red amaranth (*Amaranthus tricolor* L.)**. Vegetable Crops Research Bulletin, 74: 77-86.
- Khelifa, S., M'Hamdi, M., Rejeb, H., Belbahri, L. and Souayah, N. 2011. **Relation between catalase activity, salt stress and urban environment in *Citrus aurantium* L.** Journal of Agriculture and Forestry, 3 (6): 186-189.
- Khodary, S.E.A. 2004. **Effect of salicylic acid on growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt-stressed maize plants**. Intl. J. Agric. Biol., 6: 5–8.
- Khokon, M., Okuma, E., Rahman, A., and Mohammad-Anowar, H. 2010. **Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis***. Plant Cell Environment, 34 (3): 434-43.
- Kim, K., Min, J. and Dickman, M. 2009. **Oxalic acid is an elicitor on plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development**. Mol. Plant Microb., Interact, 21 (5): 605-612.
- Klämbt, H. 1962. **Conversion in plants of benzoic acid to salicylic acid and its  $\beta$ d-glucoside**. Nature. 196: 491.

- Klessing, D., Durner, J., Noad, R., Navarrete, D., Wendehenne, D., Kumar, D., Ma Zhou, J., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E. and Silva, H. 2000. **Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense**. PNAS, 97 (16): 8849-8855.
- Larque-Saavedra, A., Martin-Mex, R., Nexticapan-Garcez, A., Vergara-Yoisura, S., Gutierrez-Rendon, M. 2010. **Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill)**. Revista Chapingo Serie Horticultura, 16 (3): 183-187.
- Lian, B., Zhou, X., Miransari, M. and Smith, D. 2000. **Effects of salicylic acid on the development and root nodulation and of soybean seedling**. Journal of Agronomy and Crop Science, 185 (3): 187-192.
- López, M. and Stti, S. 1996. **Calcium and potassium enhanced growth and yield of tomato under sodium chloride stress**. Plant Science, 114 (1): 19-27.
- Luna, C., Pastori, G., Driscoll, S., Groten, K., Bernard, S. and Foyer, C. 2004. **Drought controls on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat**. Journal of Experimental Botany, 56 (411): 417-423.
- Mady, M. 2009. **Effect of foliar application with salicylic acid and vitamin E on growth and productivity of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) plant**. J. Agric Science Mausoura Univ., 34 (6): 6735-6746.
- Mafakheri, A, Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P. and Sohrabi, Y. 2010. **Effect of drought stress and subsequent recovery on protein, carbohydrate contents, catalase and peroxidase activities in three**

- chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars.** Australian Journal of Crop Science, 5 (10): 1255-1260.
- Magan, J., Gallardo, M., Thompson, R. and Lorenzo, P. **Effects on salinity on fruit yield of tomato grown in soil-less culture in greenhouses in Mediterranean climatic conditions.** Agricultural Water Management, 95 (9): 1041-1055
- Magbanua, Z., De Moraes, C., Brooks, T., Williams, W. and Luthe, D. 2007. **Is catalase activity one of the factor associated with maize resistance to *Aspergillus falvus*?** MPMI, 20 (6): 697-706.
- Mahdavian, K., kalantari, M. and Ghorbanli. 2007. **The effect of different concentration of salicylic acid on protective enzyme activities of pepper (*Capsicum annum* L.) plants.** Pakistan Journal of Biological Sciences, 10 (18): 3162-3165.
- Malamy, J., Henning, J. and Klessig, D. 1992. **Temperature-dependent induction of salicylic acid and its conjugates during the resistance response to tobacco mosaic virus infection.** The Plant Cell, 4: 359-366.
- Masia, A. 1998. **Superoxide dismutase and catalase activities in Apple fruit during ripening and postharvest and with special reference to ethylene.** Physiologia Plantarum, 104 (4): 668-672.
- Mateo, A., Funck, D., Mühlenbock, P., Kular, B., Mullineaux, P. and Karpinski, S. 2006. **Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis.** Journal of Experimental Botany, 57 (8): 1795-1807.



- Métraux, J. 2002. Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 7 (8): 332-334.
- Miller, N., Rice-Evans, C., Davies, M., Gopinathan, V. and Milner, A. 1993. **A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitor the antioxidant status in premature neonates.** *Clinical Science*, 84: 407-412.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. and Mittler, R. 2010. **Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stress.** *Plant, Cell and Environment*, 33: 453-467.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science*. 7 (9): 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Breusegem, F. 2004. **Reactive oxygen gene network of plants.** *Trends in Plant Science*, 9 (10): 490-498.
- Molders, W., Buchala, A. and Métraux, P. 1996. **Transport of salicylic acid in tobacco necrosis virus infected cucumber plants.** *Plant Physiology*, 112 (2): 787-792.
- Montesano, M., Brader, G. and Tapio-Palva, E. 2003. **Pathogen deliver elicitor: searching for receptors in plants.** *Molecular Plant Pathology*, 4 (1): 73-79.
- Motohashi, T., Nagamiya, K., Shamsul, H., Prodhan, H., Nakao, K., Yamamoto, Y., Moriwaki, T., Hattori, E., Asada, M., Morishima, I., Hirose, A., Ozawa, K., Takabe, T., Takabe, T., and Komamine, A. 2010. **Production of salt stress tolerant rice by over expression of the catalase gene, katE,**

**derived from *Escherichia coli*.** *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.* 18 (1): 37-41

Mustafa, N., Kin, H., Choi, Y. and Vepoorte, R. 2009. **Metabolic changes in salicylic acid-elicited *Catharanthus roseus* cell suspension cultures monitored by NMR-based metabolic.** *Biotechnol Lett*, 31: 1967–1974.

Najafian, S., Khoshkhui, M., Tavallali, V., and Saharkhiz, M. 2009. **Effect of Salicylic Acid and Salinity in Thyme (*Thymus Vulgaris* L.): Investigation on Changes in Gas Exchange, Water Relations, and Membrane Stabilization and Biomass Accumulation.** *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3 (3): 2620-2626.

Noreen, S. and Ashraf, M. 2008. **Alleviation of adverse effects of salt stress on sunflower (*Helianthus annuus* L.) by exogenous application of salicylic acid: growth and photosynthesis.** *J. Bot.*, 40 (4): 1657-1663.

Noreen, S. and Ashraf, M. 2009. **Assessment of variation in antioxidative defense system in salt treated pea (*Pisum sativum*) and its putative use as salinity tolerant markets.** *Journal of Plant Physiology*, doi:10.1016/j.jplph.2009.05.005

Noreen, S., Ashraf, M., Hussain, M., and Jamil, A. 2009. **Exogenous application of salicylic acid enhances antioxidative capacity in salt stressed sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants.** *Pakistan Journal Botanic*, 41 (1): 473-479.

Norman, C., Howell, K., Millar, A., Whelan, J. and Day, D. 2004. **Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport.** *Plant Physiology*, 34: 492-501.

- Ogawa, T., Ara, T., Aoki, K., Suzuki, H., and Shibata, D. 2010. **Transient increase in salicylic acid and its glucose conjugates after wounding in Arabidopsis leaves.** *Plant Biotechnology*, 27: 205–209.
- Olteanu, Z., Oprica, L., Truta, E. and Zamfirache, M. 2009. **Response of barley seedling to oxidative stress generated by treatments with growth hormones.** *Analele Științifice ale Universității, Alexandru Ioan Cuza, TOM X*, pp., 29-36.
- Ortega-Ortiz, H., Benavides-Mendoza, A., Mendoza-Villareal, R., Ramírez-Rodríguez, H. and De Alba, K. 2007. **Enzymatic activity on tomato fruits as a response to chemical elicitors.** *J. Mex. Chem. Soc.*, 51 (3): 141-144.
- Ozeretskovskaya, O. and Vasyukova, N. 2001. **The use of elicitors for protection of cultured plants demands caution.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 38 (3): 277-279. Panina, Y., Gerasimova, N., Chalenko, G., Vasyukova, N. and Ozeretskovskaya, O. **Salicylic Acid and Phenylalanine Ammonia-Lyase in Potato Plants Infected with the Causal Agent of Late Blight.** *Russian Journal of Plant Physiology*, 52 (4): 511–515.
- Panina, S., Gerasimova, N., Chalenco, G., Vasyukova, N. and Ozeretskovskaya, O. 2004. **Salicylic acid and phenylalanine ammonia-lyase in potato plants infected with the causal agent of late blight.** *Russian Journal of Plant Physiology*, 52 (4): 511-515.
- Park, S., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S. and Klessig, D. 2007. **Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance.** *Science*, 318: 313-316.

- Pelligrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M. and Brighenti, M. 2003. **Total Antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different In Vitro assays.** *Journal of Nutrition*, 133: 2813-2819.
- Peng, J., Deng, X., Huang, J., Jia, S., Miao, X. and Huang, Y. 2004. **Role of Salicylic Acid in Tomato Defense against Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* Hubner.** *Z. Naturforsch*, 59: 856-862.
- Petrova, V., Drescher, D., Kudjumdzieva, A. and Schmidt, M. 2004. **Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria.** *Biochemical Journal*, 380: 393–400.
- Poor, P., Gemes, K., Horvath, F., Szepesi, A., Simon, M. and Tari, I. 2010. **Salicylic acid treatment via the rooting medium interferes with estomatal response, CO<sub>2</sub> fixation rate and carbohydrate metabolism in tomato and decreases harmful effects of subsequent salt stress.** *Plant Biology*, DOI: 10.1111/j.1438-8677.2010.00344.x.
- Prithviraj, B., Bais, H., Weir, T., Suresh, B., Najarro, E., Dayakar, B., Schweizer, H. and Vivanco, J. 2005. **Down Regulation of Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* by Salicylic Acid Attenuates Its Virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*.** *Infection and immunity*, 73 (9): 5319–5328.
- Promyou, S., Ketsa, S., Wouter G. and Doorn D. 2012. **Salicylic acid alleviates chilling injury in anthurium (*Anthurium andraeanum* L.) flowers.** *Postharvest Biology and echnology*, 64: 104–110.

- Purcarea, C., and Cachita-Cosma, D. 2010. **Studies regarding the effects of salicylic acid in maize (*Zea mays* L.) seedling under salt stress.** Studia Universitat, Seria tiin ele Vie ii., 20 (1): 63-68.
- Quan, L., Zhang, B., Shi, W. and Li, K. 2008. **Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network.** J. Integrat. Plant Biol., 50 (2): 18.
- Queval, G., Issakkidis-Bourquet, E., Hoerberichts, F., Vandorpe, M., Gakiere, B., Vakiere, H., Miginiac-Maslov, M., Van, B. and Noctor, G. 2007. **Conditional oxidative stress responses in the Arabidopsis photorespiratory mutant cat2 demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death.** Plant Journal, 52 (4): 640-657.
- Radman, R., Bucke, C. and Keshavarz, T. 2004. **Elicitor effects on reactive oxygen species in liquid culture of *Penicillium chrysogenum*.** Biotechnology letters, 26 (2): 147-152.
- Ramírez, H., Riancaño-Arrijoja, J., Benavides-Mendoza, A., Mendoza-Villareal, R., Patron-Corral, E. 2006. **Influencia de promotores de oxidación controlada en hortalizas y su relación con antioxidantes.** Revista Chapingo (serie horticultura), 12 (2): 189-195.
- Raskin, I., Skubatz, H., Tang, W., and Meeuse, B. 1990. **Salicylic Acid Levels in Thermogenic and Non-Thermogenic Plants.** Annals of Botanic., 66: 369-373.

- Razack, A. and Tarpley, L. 2011. **Characterization of Rice (*Oryza sativa* L.) Physiological Responses to  $\alpha$ -Tocopherol, Glycine Betaine or Salicylic Acid Application.** Journal of Agricultural Science, 3 (1): 3-13.
- Rasmussen, B., Hammerschmidt, R. and Zook, M. 1991. **Systemic Induction of Salicylic Acid Accumulation in Cucumber after Inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*.** Plant Physiol., 97: 1342-1347.
- Rizhsky, L., Hallak-Herr, E., Van-Breusegem, F., Rachmilevitch, S., Barr, J., Rodermel, S., Inze, D. and Mittler, R. 2002. **Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase.** The Plant Journal, 32: 329–342.
- Saleh, I. and Plieth, C. 2009. **Fingerprinting antioxidative activities in plants.** Plant Methods, 5: 2. doi:10.1186/1746-4811-5-2
- Salehi, S., Khajehzadeh, A. and Khorsandi, F. 2011. **Growth of tomato as affected by foliar application of salicylic acid and salinity.** American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 11 (4): 564-567.
- Salzman, R., Brady, J., Finlayson, S., Buchanan, C., Summer, E., Sun, F., Klein, P., Pratt, L., Cordonier-Pratt, M. and Mullet, J. 2005. **Transcriptional profiling of sorghum induced by methyl jasmonate, salicylic acid, and aminocyclopropane carboxylic acid reveals cooperative regulation and novel gene responses.** Plant Physiology, 138 (1): 352-368.
- Sakhabutdinova, A., Fatkhutdinova, D., Bezrukova, M. and Shakirova, F. 2003. **Salicylic acid prevents the damaging action of stress factors on wheat plants.** Bulg. J. Plant Physiology, Special issue 2003: 314-319.

- Satti, S. and Lopez, M. 2008. **Effects of increase potassium level for alleviation sodium chloride stress on the growth and yield of tomato.** Communication on Soil Science and Plant Analysis, 25: 15-16.
- Sayyari, M., Castillo, S., Veleiro, D., Diaz-Mula, H., Serrano, M., 2011. **Acetyl salicylic acid alleviates chilling injury and maintains nutritive and bioactive compounds and antioxidant activity during postharvest storage of pomegranates.** Postharvest Biol. Technol. 60: 136–142.
- Scandalias, J. 1990. **Response of plant antioxidant defense genes to environ-mental stress.** Adv. Genet. 28 (1): 41-49.
- Seskar, M., Shulaev, V. and Raskin, I. 1998. **Endogenous Methyl Salicylate in Pathogen-Inoculated Tobacco Plants.** Plant Physiology, 166: 387-392.
- Shahrtash, M., Mohsenzadeh, S. and Mohabatkar, H. 2011. **Salicylic acid alleviates paraquat oxidative damage in maize seedling.** Asian J. Exp. Biol. Sci., 2 (3): 377-382.
- Shahba, Z., Baghizadeh, A., Vakili, S., Yazdaspanah, A. and Yosefi, M. 2010. **The salicylic acid effect on the tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) sugar, protein and proline contents under salinity stress (NaCl).** Journal of Biophysics and Structural Biology, 2 (3): 35-41.
- Shahba, Z., Baghizadeh, A. and Yosefi, M. 2010b. **The salicylic acid effect on the tomato (*lycopersicum esculentum* Mill.) germination, growth and photosynthetic pigment under salinity stress (NaCl).** Journal of Stress Physiology and Biochemistry, 6 (3): 4-16.

- Sharma, M., Sharma, A., Kumar, A. and Kumar-Basu, S. 2011. **Enhancement of secondary metabolites in cultured plant cell through stress stimulus**. American Journal of Plant Physiology, 6 (2): 50-71.
- Shi, Q. and Zhu, Z. 2008. **Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber**. Environmental and Experimental Botany, 63 (1): 317-326.
- Shim, I., Momose, Y., Yamamoto, A., Kim, DW. And Usui, K. 2003. **Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants**. Plant Growth Regulators, 39 (3): 285-292.
- Shulaev, V., León, J. and Raskin, I. 1995. **Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in Tobacco?**. The Plant Cell, 7: 1691-1701.
- Sinkevich, M., Demin, I. and Trunova, T. 2009. **Dynamics of superoxide dismutase and catalase activities during acclimation to hypothermia of wild-type and transformed potato plants**. ISSN 1648-116X LŽŪU MOKSLO DARBAI, 83 (36): 72-76.
- Soto, P., Gaete, H. e Hidalgo, M. 2011. **Assessment of catalase activity, lipid peroxidation, chlorophyll-a, and growth rate in the fresh water green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to copper and zinc**. Lat. Am. J. Aquat. Res., 39 (2): 280-285.
- Srivalli, B., Sharma, G. and Khanna-Chopra, R. 2003. **Antioxidative defense systems in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery**. Physiol. Plant 119, 503–512.



- Steiner, B. 1961. **A universal method for preparing nutrient solution of a certain desired composition.** Plant and Soil, 16 (2): 134-154.
- Stevens J., Senaratna, T and Sivasithamparam, K. 2006. **Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): associated changes in gas exchange, water relations and membrane stabilisation.** Plant Growth Regul. 49:77-83.
- Szalai, G., Paldi, E. and Janda, T. 2005. **Effects of salt stress on the endogenous salicylic acid content in maize (*Zea mayz* L.) plants.** Acta Biologica Szegediensis, 49 (1-2): 47-48.
- Szalai, G. and Janda, T. 2009. **Effect of salt stress on the salicylic acid synthesis in young maize (*Zea mays* L.) plants.** Journal of Agronomy and Crop Science, 193 (3): 165-171.
- Szepesi, A. 2006. **Salicylic acid improves the acclimation of *Lycopersicon esculentum* Mill. L. to high salinity by approximating its salt stress response to that of the wild species *L. pennellii*.** Acta Biologica Szegediensis, 50 (3-4): 177.
- Szepesi, A., Poor, P., Gemes, K., Horvath, H. and Tari, I. 2008. **Influence of exogenous salicylic acid on antioxidant enzyme activities in the roots of salt stressed tomato plants.** Acta Biologica Szegediensis, 52 (1): 199-200.
- Szepesi, A., Criszar, K., Horvath, E., Horvat, F., Simon, M. and Tari, I. 2009. **Salicylic acid improves acclimation to stress by stimulating abscisic aldehyde oxidase activity and abscisic acid accumulation and increase Na<sup>+</sup> content in leaves without toxicity symptoms in *Solanum lycopersicum* L.** J. Plant Physiology, 166: 917-928.

- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H., Han, R., Zhu, T., Zou, G. and Katagiri, F. 2003. **Quantitative Nature of Arabidopsis Responses during Compatible and Incompatible Interactions with the Bacterial Pathogen *Pseudomonas syringae***. *The Plant Cell*, 15: 317–330.
- Tari, I., Csiszar, J., Szalai, G., Horvath, F., Pecsvaradi, A., Kiss, G., Szepesi, A., Szabo, M., Erdei, L. 2002. **Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pre-treatment**. *Acta Biologica Szegediensis*, 43 (3-4): 55-56.
- Tuna, L., Kaya, C., Dikilitas, M., Yokas, I., Burum, B. and Altulnu, H. 2007. **Comparative effect of various salicylic acid derivates on key growth parameters and some enzyme activities in salinity stressed maize (*Zea mays* L.) plants**. *Pak. J. Bot.*, 39 (3): 787-798.
- Umebese, C., Olatimilehin, T. and Ogonsusi, T. 2009. **Salicylic acid protects nitrate reductasa activity, growth and proline in amaranth and tomato plants during water deficit**. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4 (3): 224-229.
- Urbani, P., Ranmuno, A., Filosa, R., Pinto, A., Popolo, A., Bianchino, E., Piotto, S., Saturnino, C., De Prisco, R., Nicolaus, B. and Tommonaro, G. 2008. **Antioxidant activity of diphenylpropionamide derivates: synthesis, biological evaluation and computational analysis**. *Molecules*, 13: 749-761.
- Valero, D., Díaz-Mula, H., Zapata, P., Castillo, S., Guillen, F., Martinez-Romero, D. and Serrano, M. 2011. **Postharvest treatments with salicylic acid, acetylsalicylic acid or oxalic acid delayed ripening and enhance**

**bioactive compound and antioxidant capacity in sweet cherry.** J. Agric. Food Chem., 59 (19): 5483-5489.

Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Gruissem, W., Inze, D. and Breusegem, F. 2005. **Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in Arabidopsis reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis.** Plant Physiology 139, 806–821.

Verma, S. and Dubey, R. 2003. **Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants.** Plant Science, 164: 645-655.

Villanueva-Couoh, E., Alcántar-González, G., Sánchez-García, P., Soria-Fregoso, M. y Larque-Saavedra, A. 2009. **Efecto del ácido salicílico y dimetilsulfoxido en la floración de [Chrysanthemum morifolium(Ramat) Kitamura] en Yucatán.** Revista Chapingo. Serie horticultura, 15 (2): 25-31.

Wang, Y., Wang, J., Yang, Z., Wang, Q., Li, S., Lu, Y., Wang, S. and Sun, X. 2004. **Salicylic acid modulates aluminum-induced oxidative stress in roots of *Cassia tora*.** Acta Botanica Sinica, 46 (7): 819-828.

Wang, L. and Li, S. 2005. **Salicylic acid induced heat or cold tolerance in relation to Ca homeostasis and antioxidant systems in young grape plants.** Plant Science, 170: 685-694.

Wang, L., Fan, L., Loescher, W., Duan, W., Lui, J., Cheng, J., Luo, H. and Li, S. 2010. **Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat**

**stress and accelerates recovery in grapevine leaves.** *Plant Biology*, 10:34.

Wassem, W., Athar, H. and Ashraf, M. 2006. **Effect of salicylic acid applied through rooting medium on drought tolerance of wheat.** *Pak. J. Bot.*, 38 (4): 1127-1136.

Wei, Y., Lui, Z., Su, Y., Lui, D. and Ye, X. 2011. **Effect of salicylic acid treatment on postharvest quality, antioxidant activities and free polyamines on asparagus.** *Journal of Food Science*, 76 (2): s126-s132.

Wildermuth, M., Dewdney, J., Wu, G. and Ausubel, F. 2001. **Isochorismatase synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense.** *Nature*, 414: 562-566.

Wildermuth, M. 2006. **Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids.** *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 288–296.

Willekens, H., Chamnongpol, S., Daney, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van-Montagu, M., Inze, D. and Van-Camp, W. 1995. **Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C<sub>3</sub> plants.** *The EMBO Journal*, 16 (16): 4806–4816.

Xing, Y., Jia, W. and Zhang, J. 2007. **AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of CAT1catalase by triggering H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in Arabidopsis.** *Journal of Experimental Botany*, 58 (11): 2969–2981.

Xing, Y., Jia, W. and Zhang, J. 2008. **AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production via AtMPK6-coupled signaling in Arabidopsis.** *The Plant Journal* 54, 440–451

- Xu, X. and Tian, S. 2008. **Salicylic acid alleviated pathogen induced oxidative stress in harvested sweet cherry fruit.** *Postharvest biology and technology*, 49: 379-385.
- Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T., Kleier, D. and Raskin, I. 1991. **Salicylic acid is a systemic signal of pathogenesis related protein in virus infected tobacco.** *The Plant Cell*, 3: 809-818.
- Yalpani, N., León, J., Lawton, M. and Raskin, I. 1993. **Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus inoculated tobacco.** *Plant Physiology*, 103: 315-321.
- Yildirim, E. and Dursum, A. 2009. **Effect of foliar salicylic acid applications on plant growth and yield of tomato under greenhouse conditions.** *Acta Horticulturae*, 807 (1): 395-400.
- Yildirim, E., Turan, M., and Guvenc, I. 2008. **Effect of foliar salicylic acid applications on growth, chlorophyll, and mineral content of cucumber grown under salt stress.** *Journal of Plant Nutrition*, 31 (3): 593-612.
- Yokioi, S., Bressan, A. and Hasegawa, M. 2002. **Salt stress tolerance on plants.** *JIRCAS Working Report*, 2002: 25-33.
- Yusuf, M., Hasan, S., Ali, B., Hayat, S., and Fariduddin, Q. 2008. Effect of salicylic acid on salinity-induced changes in *Brassica juncea*. ***Journal of Integrative Plant Biology*. 50 (9):1096-1102.**
- Zamocky, M., Furtmüller, P. and Obinger C. 2008. **Evolution of catalases from bacteria to humans.** *Antioxidants and Redox Signaling*, 10 (9): 1527–1547.

- Zhang, Z., Li, Q., Li, Z., Staswick, P., Wang, M., Zhu, Y., and He, Z. 2009. **Dual regulation role of GH3.5 in Salicylic Acid and Auxin during Arabidopsis-*Pseudomonas syringae* interaction.** *Plant Physiology*, 145: 450–464.
- Zhang, X., Schimidt, R. and Ervin, E. 2009b. **Impact of salicylic acid on bermudagrass freezing tolerance associated with abscisic acid and antioxidant metabolism.** *Research Journal*, 11: 893-902.
- Zhao, J., Davis, L. and Vepoorte, R. 2005. **Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites.** *Biotechnology Adv.*, 23 (4): 283-333.