

# El estrés por temperatura provoca necrosis en tabaco negro; cuantificación por análisis de imágenes

## Temperature stress provoke necrosis in black tobacco; quantification by image analysis

Adriana Navarro Borrell<sup>1</sup>, Rosa Rodés<sup>2</sup>, Patricia Ortega-Rodés<sup>3</sup>, Eduardo Ortega<sup>4</sup>

---

### Resumen

El tabaco negro (*Nicotiana tabacum* L.) es un importante cultivo económico en Cuba por su uso en la manufactura de puros Habanos. Factores bióticos y abióticos lo afectan, de ahí que sea valioso el estudio de los daños fisiológicos que le produce el estrés. El objetivo de este trabajo fue cuantificar los efectos del estrés por temperatura sobre el daño por necrosis en hojas, y determinar la acumulación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) *in situ* en los tejidos de *Nicotiana tabacum* L. (variedad Habana-2000). Se aplicaron diferentes tratamientos de temperatura (4 °C, 25 °C, 45 °C y 60 °C) a hojas de plantas de 4 semanas de edad; la necrosis se reveló con solución de azul de tripano. El área de tejidos con acumulación de peróxido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en plántulas completas de 7 días de edad, sometidas a las mismas condiciones de estrés, se determinó con DAB. Se estimó el porcentaje de área necrosada y de acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando el programa de análisis y procesamiento de imágenes ImageJ. Este programa es capaz de adquirir, mostrar, editar, resaltar y analizar imágenes. Se demostró que las hojas sometidas a 4 °C, independientemente del tiempo de exposición, presentaron una mayor área necrosada (35%) en comparación con el resto de los tratamientos. Las áreas con acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in situ* fueron mayores en los tratamientos de estrés por temperaturas altas (45 y 60 °C). La detección y cuantificación de la necrosis producida por temperaturas extremas, combinando el método del azul de tripano con el análisis de imágenes, es una herramienta útil para valorar los daños producidos por estrés de temperaturas y pudiera ser utilizado para valorar los daños celulares provocados por otros tipos de estrés.

**Palabras clave:** variedad-Habana-2000, especies reactivas de oxígeno, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### Abstract

Black tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) is an important cash crop in Cuba; it is used in the manufactury of Habano cigars. Biotic and abiotic factors affect it, so the studies of physiological damages caused by stress are valuable. The aim of this research was to quantify the effects of temperature stress causing necrotic

- 
- 1 Licenciada en Biología, Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana. adria@fq.uh.cu
  - 2 Doctora en Ciencias Biológicas. Profesor Titular, Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana. rrodes@fq.uh.cu
  - 3 MSc. Biología, Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana. Vegetal.portega@fq.uh.cu
  - 4 Doctor en Ciencias Biológicas. Profesor Titular, Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana. eortega@fq.uh.cu. Autor para la correspondencia.

damage in leaves and to determine the accumulation of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) *in situ* on the tissues of *Nicotiana tabacum* L. (variety Havana-2000). Different treatments of temperature were applied (4 °C, 25 °C, 45 °C and 60 °C) in leaves of 4 weeks old plants; the necrosis was revealed with trypan blue solution. The area of peroxide accumulation ( $H_2O_2$ ) in tissues of complete plants 7 days after germination, submitted to the same stress conditions, was determined with DAB. The percentage of necrotic area and of accumulation of  $H_2O_2$  was measured using the ImageJ software. It can acquire, display, edit, enhance, and analyze images. It was demonstrated that leaves treated to temperature of 4 °C, independently of the time of exhibition, presented a bigger necrotic area (35%) in comparison with the rest of the treatments. The areas with  $H_2O_2$  accumulation *in situ* were higher in the stress treatments with higher temperatures (45 °C and 60 °C). The detection and quantification of the necrosis produced by extreme temperatures combining the trypan blue method with the analysis of images is a useful tool to evaluate damages produced by temperature stress and it could be used to evaluate cell damages provoked by other types of stress.

**Key words:** Habana-2000-variety, reactive oxygen species,  $H_2O_2$ .

Recibido: abril 15 de 2008

Aprobado: noviembre 24 de 2008

## Introducción

En Cuba se produce un tabaco negro (*Nicotiana tabacum* L.) de muy alta calidad, con el cual se manufacturan los famosos puros Habanos. La variedad Habana-2000 ocupa más del 50% del área sembrada en Cuba para producir la hoja que se usa como capa para cubrir y dar terminación a los Habanos (Guerra et ál., 2000). Aunque esta variedad fue seleccionada por su resistencia a muchas de las principales enfermedades del tabaco, es susceptible a otras como el virus del mosaico (Méndez-Barceló et ál., 2007); su valor económico es tal que merece se profundice en su fisiología ante condiciones de estrés.

Todas las plantas están sometidas a factores de estrés, tanto abióticos como bióticos; las especies reactivas de oxígeno (ERO), principalmente el peróxido ( $H_2O_2$ ), participan como señales en la fisiología de las mismas, y tienen un papel clave en la interacción cruzada entre las señales provocadas tanto por estrés biótico como abiótico (Fujita et ál., 2006).

La temperatura es uno de los factores que mayor influencia tiene sobre el desarrollo de los cultivos y las variaciones en este parámetro pueden iniciar otras manifestaciones de estrés

durante las diferentes épocas del año. Las temperaturas a las que se someten los cultivos en el campo son generalmente altas; los valores medios anuales de temperatura del aire en Cuba están entre **24 °C** y **26 °C**. La temporada de noviembre a abril es menos calurosa y se conoce como invierno, mientras que los meses de mayo a octubre, más calurosos, son el verano. Las temperaturas máximas y mínimas absolutas registradas son de **38,6 °C** (agosto de 1969) y **0,6 °C** (febrero de 1996). Como es típico en los climas tropicales, la variación diaria de la temperatura puede ser mayor que la anual.

En las plantas la necrosis celular es un evento que se define como la muerte accidental, pasiva e indiscriminada de células causada por agentes externos, debido a la acumulación fitotóxica de moléculas específicas después de un evento traumático; es irreversible y se caracteriza por la pérdida progresiva de la integridad de membrana que resulta en la liberación de los componentes celulares (Breusegem y James, 2006).

Se conoce además que la necrosis de tejidos en plantas expuestas a enfermedades o a estrés abiótico está relacionada con la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO), (Király et ál., 1993; Baker y Orlandi, 1995;

Fodor et ál., 2001). De hecho, se asume que la acumulación de ERO puede ser responsable de las respuestas de hipersensibilidad en las plantas, así como también de la resistencia a determinadas plagas.

Las ERO se producen constantemente como bioproductos de vías metabólicas que tienen lugar en diferentes compartimientos celulares en las plantas. En condiciones normales estas moléculas son eliminadas mediante diversos mecanismos de defensa. (Foyer y Noctor, 2000). El equilibrio entre la producción y la eliminación de ERO puede ser perturbado por numerosos factores ambientales, y en consecuencia, los niveles intracelulares de ERO pueden aumentar rápidamente (Elstner, 1991).

El análisis de imágenes ha sido utilizado para evaluar daños en las plantas provocados por factores de estrés. Tucker y Chakraborty (1997) desarrollaron un programa de computación para detectar y caracterizar las lesiones de las hojas de cebada y girasol afectadas por dos enfermedades foliares. Kwat et ál. (2005) usaron un programa comercial para medir por análisis de imágenes las lesiones provocadas por la antracnosis del pepino (*Colletotrichum orbiculare*). Los efectos de factores bióticos y abióticos sobre las hojas de tabaco negro no han sido documentados utilizando una técnica tan útil y precisa como el análisis de imágenes.

El objetivo de este trabajo es cuantificar, utilizando el análisis computarizado de imágenes, el grado de necrosis celular por efecto de diferentes temperaturas, tomadas como modelo de estrés, así como la producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) *in situ* en plantas de *Nicotiana tabacum* L. (variedad Habana-2000).

## **Materiales y métodos**

### ***Plantas y condiciones de estrés***

Se utilizaron plantas de *Nicotiana tabacum* L., variedad Habana-2000, cultivadas en condiciones de temperatura controladas ( $25 \pm 2$  °C)

con 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Las plantas se desarrollaron en suelo ferralítico amarillento lixiviado típico eútrico, con riego óptimo hasta 4 semanas después de la germinación. Se cortaron las hojas 2 y 3 (considerando la hoja 1 el primordio foliar apical) y se sometieron a estrés de temperatura. Los tratamientos fueron: 4 °C, 25 °C, 45 °C y 60 °C, aplicados durante 15 min utilizando un baño de agua a temperatura controlada, y se hicieron 3 réplicas por tratamiento. El tratamiento que más necrosis indujo a corto plazo (4 °C), se valoró también por períodos de 15, 60 y 240 minutos.

### ***Detección y cuantificación de la necrosis celular***

El grado de necrosis producido por los tratamientos fue evaluado en las hojas enteras, las cuales fueron teñidas con solución de azul de tripano (10 mL de ácido láctico, 10 mL de glicerol, 10 mL de fenol y 10 mg de azul de tripano disueltos en 10 mL de agua destilada) según el método de Keogh (Koch y Slusarenko, 1990). Las hojas se agitaron durante 24 h en la solución de tinción con azul de tripano y posteriormente fueron aclaradas con etanol al 90% durante 12 h con agitación, lo que constituye una modificación al método original que utiliza hidrato de cloral para clarificar después de la tinción. Las imágenes de las hojas fueron registradas en escáner V600, modelo MRS-1200V6P con una resolución de 100 dpi; estudios previos demostraron que resoluciones mayores no mejoraron la precisión de los resultados y, sin embargo, sí incrementaron el tamaño (Mb) de la imagen (datos no mostrados). La proporción entre el área de tejido necrosado debido a los tratamientos y el área total de las hojas se determinó a través del procesamiento y análisis de imágenes con el Programa ImageJ, (Abramoff et ál., 2004). ImageJ puede ser utilizado para medir área, media, centroide, perímetro, etc., de selecciones de interés. Además, cuenta con analizador de partículas automático y herramientas para determinar longitudes y ángulos. La calibración espacial permite obtener medidas reales y los resultados

se pueden imprimir, exportar hacia archivos de texto u hojas de cálculo.

### ***Detección in situ del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los tejidos de las plantas sometidas a estrés***

Se tomaron plántulas completas de una semana después de la germinación y se lavaron cuidadosamente para no dañar las raíces. Se colocaron en viales con las raíces sumergidas en 200 µL de solución de 3,3 diaminobenzidina (DAB) mg mL<sup>-1</sup>, pH =3,8 (Thordal-Christensen et ál., 1997) y se mantuvieron durante 1 h en la oscuridad a 25 °C para que absorbieran el DAB. A continuación las muestras se colocaron en un baño de agua de temperatura controlada a 4 °C, 25 °C, 45 °C ó 60 °C durante 1h, con iluminación proporcionada por dos lámparas (cada una con un tubo de luz fluorescente de 40 W, una iluminando desde arriba y otra lateralmente, a una distancia aproximada de 1 m de las plantas); las raíces se mantuvieron en la solución DAB. Después de la aplicación de los diferentes tratamientos, las plántulas fueron clarificadas por agitación en etanol al 90% durante 15 min. Las imágenes se obtuvieron usando un escáner en las mismas condiciones explicadas anteriormente. El área de los órganos donde se acumuló H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hojas, tallos y raíces) se visualizó por el cambio de color que ocurre en los mismos (Thordal-Christensen et ál., 1997) y el área oscurecida se midió utilizando el Programa ImageJ (Abramoff et ál., 2004) y se expresó como porcentaje del área total.

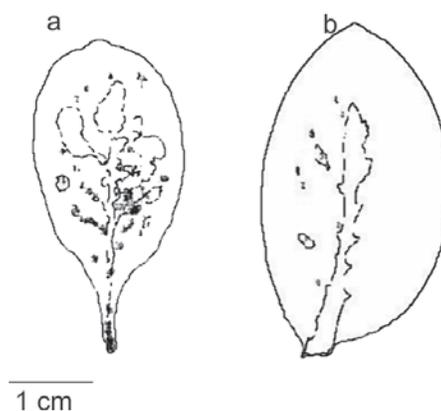
### ***Análisis estadístico***

Se utilizó un diseño completamente aleatorio en todos los experimentos. Se comprobó el cumplimiento de la normalidad y la homogeneidad de varianza en cada caso. Se realizó un Anova de clasificación simple para detectar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos. Se hizo una comparación múltiple de medias mediante la prueba SNK. Las pruebas estadísticas se realizaron en el programa Statistica (versión 6.0).

## **Resultados**

### ***Uso del análisis de imágenes para cuantificar los daños por estrés***

La figura 1 es un ejemplo de cómo se presentan los resultados durante el uso del Programa para el análisis de las imágenes, lo que permite eliminar el factor subjetivo al comparar los tratamientos.

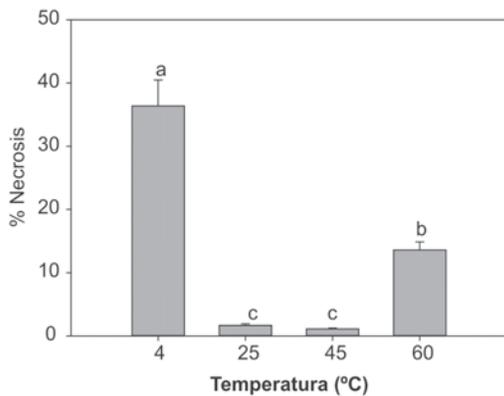


**Figura 1.** Imagen editada para mostrar ejemplos de los resultados obtenidos con el Programa ImageJ, al realizar las mediciones del área necrosada en hojas individuales de los tratamientos a 4 °C (a) y a 60 °C (b). Junto a cada mancha necrótica el Programa incluye un número que la identifica, de la que proporciona el valor del área individual (mm<sup>2</sup>). El Programa permite también conocer el área afectada total como la sumatoria de las manchas individuales, así como el área completa de cada hoja.

### ***Necrosis celular producida por estrés de temperatura***

Después de aplicar los tratamientos de temperatura, la aplicación de solución con azul de tripano a las hojas reveló los tejidos necrosados, lo cual pudo ser observado en las imágenes escaneadas de los diferentes tratamientos (figura 2). El azul de tripano se acumula en las células muertas (Peng et ál., 2003) y eso facilita la observación de las áreas necrosadas.

Los tratamientos a 4 °C y 60 °C indujeron una mayor proporción de tejido foliar con

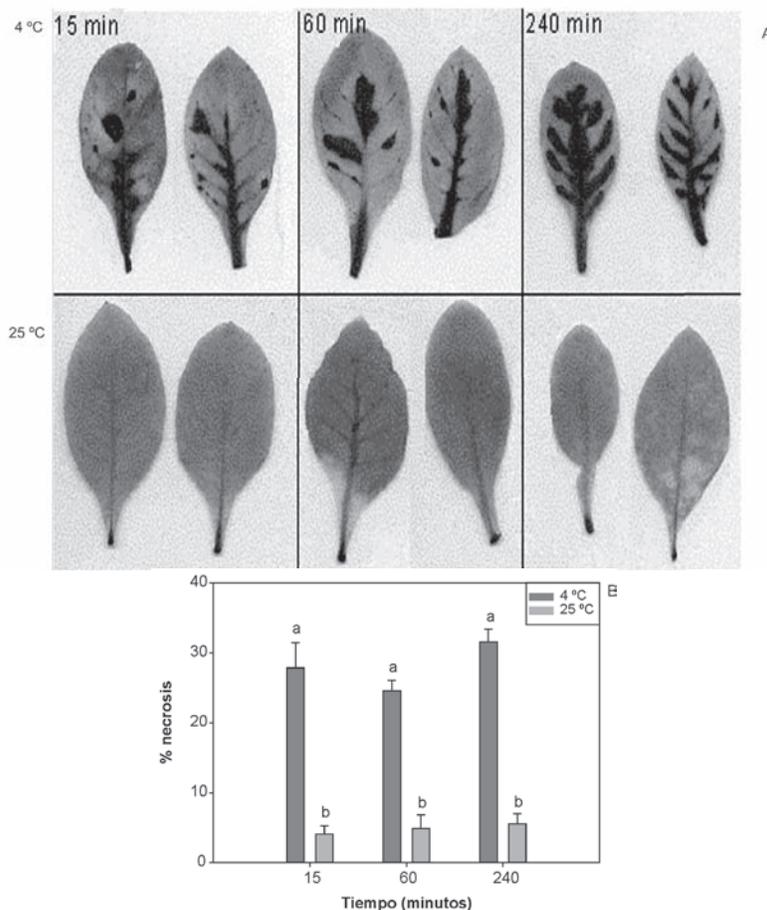


**Figura 2.** Porcentaje del área foliar afectada por necrosis celular en hojas de tabaco negro sometidas a diferentes estreses de temperaturas durante 15 min, n = 3. Las barras verticales representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas para  $\alpha = 0,05$ .

necrosis celular, la mayor cantidad relativa ocurrió en el tratamiento a 4 °C (figura 2), donde se afectó hasta el 35% del área de la superficie total de la hoja, en sólo 15 min. Debido a estos resultados, la temperatura de 4 °C se utilizó para determinar el efecto del tiempo de estrés sobre la necrosis.

***Efecto del tiempo de exposición a 4 °C sobre el grado de necrosis celular en el tejido foliar***

Si bien a simple vista parece que el tiempo de exposición tuvo consecuencias sobre el área necrosada (figura 3), el análisis de las imágenes permitió hacer una valoración más precisa. Las ventajas de esta metodología en este tipo de



**Figura 3.** Necrosis celular detectada en hojas de tabaco mantenidas durante diferentes tiempos de exposición a 4 °C y 25 °C (control). (a) Hojas teñidas con azul de tripano. (b) Cuantificación de necrosis celular (%). n = 3. Las barras verticales representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas para  $\alpha = 0,05$ .

trabajo son evidentes y nos permiten proponer su uso para estudios semejantes.

Como ya se había demostrado previamente, hay diferencias en la necrosis de los tejidos sometidos a 25 °C y 4 °C, pero el aumento del tiempo de exposición de las hojas a 4 °C no provocó diferencias significativas en el porcentaje de área necrosada de los tejidos foliares, determinado por el análisis de imágenes. Tampoco se observa un patrón de tendencia del efecto de la necrosis a medida que se incrementa el tiempo del tratamiento (figura 3).

### Acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in situ* en tejidos sometidos al estrés de temperatura

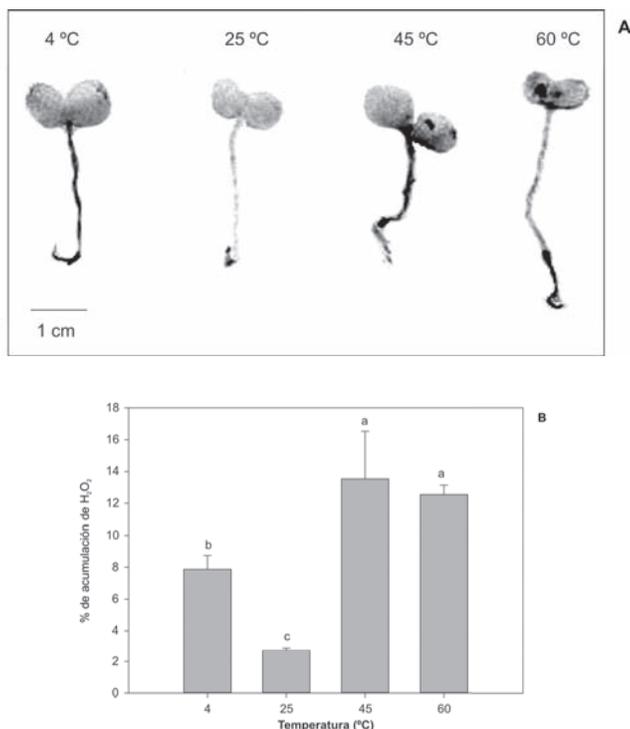
Las plántulas sometidas a estrés por temperatura durante un tiempo corto (1 h) mostraron áreas de color marrón que son señal de que

en los tejidos se acumuló H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debido al tratamiento, y éste reaccionó con DAB. Las áreas de acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las plántulas fueron mayores en raíces, seguidas del tallo y las hojas (figura 4).

Los valores más notables se detectaron en los tratamientos de estrés por calor. El tratamiento a 45 °C provocó valores medios de áreas con acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in situ* de 13,5% en relación con la superficie total de la plántula. A 60 °C se obtuvo una acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del 12,5%, y a 4 °C solamente un 7,9%. Todos los valores resultan significativamente diferentes del control, que mostró un 2,8% de área con acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 4).

### Discusión

La necrosis celular es uno de los eventos que más ocurren ante situaciones de estrés (Op



**Figura 4.** Detección de la formación de peróxido de hidrógeno *in situ* en plántulas de tabaco de 7 días de cultivo sometidas a diferentes tratamientos de temperatura durante 1h. (a) Hojas teñidas con DAB. Las manchas oscuras en las hojas, tallos y raíces se corresponden con las áreas de acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (b) Proporción del área total con acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, n = 3. Las barras verticales representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas para  $\alpha = 0,05$ .

den Camp et ál., 2003), sin embargo, se han mencionado pocas o ninguna vía para determinar cuantitativamente la envergadura del daño celular.

La tinción con azul de tripano es una de las vías más utilizada para la detección cualitativa de la necrosis, debido a que dicho compuesto es capaz de introducirse en las células muertas tiñéndolas de azul intenso o negro, mientras que las células saludables (exceptuando las venas) aparecen hialinas después que se eliminan los pigmentos naturales de los tejidos vegetales (Peng et ál., 2003). Un ejemplo de los resultados alcanzados en este trabajo al utilizar el azul de tripano para detectar necrosis en tejidos afectados por condiciones de estrés se presenta en la figura 2. El uso de etanol 90% en sustitución del hidrato de cloral, usado en muy alta concentración ( $2,5 \text{ g mL}^{-1}$ ) en el protocolo original para clarificar los tejidos de las hojas, resultó muy eficiente, y se obtuvo una decoloración exitosa sin perderse el azul de tripano que se había acumulado en los tejidos necróticos (figura 3A). Una ventaja adicional es que el etanol resulta inocuo para el investigador que realiza los protocolos de trabajo. El hidrato de cloral es una sustancia tóxica a las concentraciones utilizadas para decolorar los tejidos; según Cooper (2007), una concentración superior a  $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  es tóxica.

La estimación a simple vista del grado de necrosis en un órgano vegetal como la hoja es muy difícil y puede llegar a producir percepciones engañosas, como ocurre al observar los resultados de la figura 3A. El análisis de imagen permite evitar el subjetivismo en este tipo de estudio (figura 3B).

El programa ImageJ facilitó la cuantificación del área total y del área afectada de los órganos analizados (figura 1). Este programa utiliza una serie de comandos para analizar imágenes modificadas a 8-bit en escala de grises. Durante las mediciones sólo los píxeles resaltados son incluidos en el proceso en dependencia del “Umbral” (*Threshold*) establecido.

El “Umbral” se utiliza para establecer valores mínimos y máximos de detección, separando la imagen en las zonas de interés y el fondo. Los píxeles con valores de brillo y contraste mayores o iguales al umbral mínimo, y aquellos menores o iguales que el umbral máximo aparecen en rojo mientras se usa el programa.

El comando “Analizar Partículas” (*AnalyzeParticles*) sirve para medir el conjunto de características seleccionadas. El cálculo de áreas se realiza después de la calibración, para lo que se emplea el comando “Establecer Escala” (*Set Scale*), que permite implantar la escala espacial real de la imagen con ayuda de un patrón de medidas conocido que se incluye en la imagen al escanearla.

El modo más eficiente para organizar los resultados es mediante el uso de una hoja de cálculo.

Los tejidos foliares de tabaco de la variedad Habana-2000 presentaron mayor necrosis a bajas temperaturas ( $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ ) que a las temperaturas altas aplicadas. La necrosis es un evento celular que ocurre de modo caótico y descontrolado (Reape et ál., 2008) en el cual ocurre lisis celular. En esta condición extrema los sistemas de protección de la planta no fueron suficientes, y ocurrió lisis celular en mayor proporción detectable y cuantificable por los métodos empleados. La diferencia pudiera estar relacionada con el hecho de que el tabaco tiene origen en zonas tropicales de América; además, la variedad en cuestión fue seleccionada en Cuba donde la temperatura del aire puede llegar a ser de más de  $38 \text{ } ^\circ\text{C}$  (Lecha-Estela y Florido-Trujillo, 1989). Se ha informado que la variedad Habana-2000 (Méndez-Barceló et ál., 2007) es resistente a la necrosis ambiental; que la mayor necrosis sólo haya sido provocada por las bajas temperaturas ( $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ ) debe analizarse como positivo, ya que más de la mitad de la superficie de la provincia de Pinar del Río, con participación en la producción tabacalera, sólo tiene un 5% de probabilidad de que la temperatura mínima absoluta del aire alcance valores entre  $4$  y  $6 \text{ } ^\circ\text{C}$  (Lecha-Estela y Florido-Trujillo, 1989).

Toda la superficie de la provincia de Pinar del Río tiene 95% de probabilidad de tener valores de temperatura máxima absoluta entre 32 y 34 °C (Lecha-Estela y Florido-Trujillo, 1989); el pequeño valor de necrosis provocado al someter las hojas a temperaturas de 45 °C (figura 2) tiene una significación práctica muy valiosa ya que serían despreciables las afectaciones que provocarían las temperaturas máximas del aire registradas en esta zona y otras del país donde se cultiva el tabaco negro para la producción de puros Habanos.

Además del estrés de temperatura analizado, las plantas están expuestas continuamente a varios estreses abióticos y bióticos, y para sobrevivir a tales condiciones han desarrollado intrincados mecanismos para percibir las señales externas. La producción de ERO, y muy especialmente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ha sido propuesta como proceso clave en respuesta a los estreses abióticos y bióticos, y se conoce que existe una interacción cruzada entre ellos (Fujita et ál., 2006). Teniendo en cuenta que muchos tipos de estrés inducen la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se cuantificó este metabolito en condiciones de estrés de temperatura. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede considerarse una señal que induzca la síntesis o activación de sistemas antioxidantes tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR) (Neill et ál., 2002).

Las áreas donde se detectó el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las plántulas de tabaco sometidas a 4 °C, 45 °C y 60 °C, fueron significativamente mayores que el control a 25 °C, y se obtuvieron los mayores valores a 45 °C y 60 °C, en ese orden. Las raíces fueron los órganos donde se observó mayor proporción de coloración marrón más intensa (indicativa de formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que reacciona con DAB) comparado con los tallos y las hojas (figura 4). Lee et ál. (2004) encontraron acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el orden mili-molar en las cercanías de las membranas plasmáticas de raíces de pepino expuestas a bajas temperaturas. El objetivo de estudiar plántulas completas de tabaco sometidas a estrés de temperatura fue determinar

su efecto sobre la distribución del peróxido en toda la planta.

El peróxido de hidrógeno, además de su papel como especie reactiva de oxígeno, funciona como una molécula señal (Mino et ál., 2004). Songjie et ál. (2006) plantean que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede ser capaz de translocarse por el xilema y actuar como una de las señales de la raíz para controlar el movimiento de los estomas. Los resultados de este trabajo no muestran una aparente translocación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> más allá del tallo, al menos a 4 °C. La acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los tejidos a altas temperaturas (45 y 60 °C) pudiera actuar como señal que active sistemas antioxidantes que impidan mayores acumulaciones de estos compuestos tóxicos y eviten mayor daño celular (Baptista et ál., 2007).

La detección y cuantificación de la necrosis y la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in situ* producidas por temperaturas extremas, combinando el método del azul de tripano con el análisis de imágenes, constituyen herramientas útiles para valorar los daños producidos por estrés de temperaturas y pudiera ser utilizado para valorar los daños celulares provocados por otros tipos de estrés.

## Referencias bibliográficas

- Abramoff, M. D.; Magelhaes, P. J.; Ram, S. J. 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11, 36-42.
- Baker, C. J.; Orlandi, E. W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33, 299-321.
- Baptista, P.; Martins, A.; Pais, M. S.; Tavares, R. M.; Lino-Neto, T. 2007. Involvement of reactive oxygen species during early stages of ectomycorrhiza between *Castanea sativa* and *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza* 17, 185-193.
- Breusegem, F. V.; James, F. D. 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology* 141, 384-390.
- Cooper, J. S. 2007. Toxicity, sedative-hypnotics. [online] Disponible en URL: <http://www.emedicine.com/EMERG/topic525.htm> [Fecha de consulta 14 de abril de 2008]

- Elstner, E. F. 1991. Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. En: Pelland, E. J.; Steffen, K. L. (eds.). Active oxygen/oxidative stress in plant metabolism, (Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists). pp. 13-25.
- Fodor, J.; Hideg, É.; Kecskés, A.; Király, Z. 2001. In vivo detection of tobacco mosaic virus-induced local and systemic oxidative burst by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Plant and Cell Physiology* 42, 775-779.
- Foyer, C. H.; Noctor, G. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: Regulation and signaling. *New Phytologist* 146, 359-388.
- Fujita, M.; Fujita, Y.; Noutoshi, Y.; Fuminori T. F.; Narusaka, Y.; Yamaguchi-Shinozaki K.; Shinozaki, K. 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 436-442.
- Guerra, J. G.; Rodríguez-López, N.; Andino-Ruibal, V.; Hernández-García, B. 2000. Influencia de la distancia entre plantas y la altura de desbotonado en algunos indicadores económicos de la variedad "Habana 2000" cultivado bajo tela. *Avances*. Vol 2. [online] 2000 Abril-Junio Disponible en URL <http://www.ciget.pinar.cu/No.%202000-2/TABACO.htm> [Fecha de consulta 12 de abril de 2008].
- Király, Z.; El-Zahaby, H.; Galal, A.; Abdou, S.; Ádám, A.; Barna, B.; Klement, Z. 1993. Effect of oxy free radicals on plant pathogenic bacteria and fungi and on some plant diseases. En: Mózsik, G.; Emerit, I.; Fehér, J.; Matkovic, B.; Vincze, Á. (eds.). *Oxygen Free Radicals and Scavenging in the Natural Sciences*. Budapest: Akad Kiadó. pp. 9-19.
- Koch, E.; Slusarenko, A. 1990. Arabidopsis is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *The Plant Cell* 2, 437-445.
- Kwack, M. S.; Kim, E. N.; Lee, H.; Kim, J. W.; Chun, S. Ch.; Kim, K. D. 2005. Digital image analysis to measure lesion area of cucumber anthracnose by *Colletotrichum orbiculare*. *Journal of Genetical Plant Pathology* 71, 418-421.
- Lecha-Estela, L. B.; Florido-Trujillo, A. 1989. Principales características climáticas del régimen térmico del archipiélago cubano. La Habana: Editorial Academia.
- Lee, S. H.; Singh, A. P.; Cheng, G. Ch. 2004. Rapid accumulation of hydrogen peroxide in cucumber roots due to exposure to low temperature appears to mediate decreases in water transport. *Journal of Experimental Botany* 55, 1733-1741.
- Méndez-Barceló, A.; Rivas-Diéguez, A.; del Toro-Borrego, M. 2007. Elementos bioetológicos de las principales plagas del cultivo del tabaco en la zona norte de la provincia de Las Tunas. Ciudad de La Habana: Editorial Universitaria.
- Mino, M.; Abe, S.; Suzuki, T.; Yokoyama, H.; Kaminaka, H.; Ogawa, K.; Morita, S.; Masumura, T.; Kunisuke Tanaka, K.; Inoue, M. 2004. Hydrogen peroxide functions as a cell death signal for hybrid lethality in the F<sub>1</sub> of *Nicotiana glauca* × *N. tabacum*. *Plant Science* 167, 267-274.
- Neill, S. J.; Desikan, R.; Hancock, J. T. 2002. Hydrogen peroxide signaling. *Plant Biology* 5, 338-395.
- Op den Camp, R.; Przybyla, D.; Ochsenbein, Ch.; Laloi, Ch.; Kim, Ch.; Danon, A.; Wagner, D.; Hideg, E.; Göbel, C.; Feussner, I.; Nater, M.; Apel, K. 2003. Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in Arabidopsis. *The Plant Cell* 15, 2320-2332.
- Peng, J. L.; Dong, H. S.; Dong, H.-P.; Delaney, T. P.; Bonasera, J. M.; Beer, S. V. 2003. Harpin-elicited hypersensitive cell death and pathogen resistance require the NDR1 and EDS1 genes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62, 317-326.
- Reape, T. J.; Molony, E. M.; McCabe P. F. 2008. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *Journal of Experimental Botany*. Disponible en <<http://jxb.oxfordjournals.org/cgi/reprint/59/3/435>> doi:10.1093/jxb/erm258
- Songjie, Y.; Conglin, H.; Zhongyi, W.; Jianfang, H.; Tianzhong, L.; Shigui, L.; Wensuo, J. 2006. Stomatal movement in response to long distance-communicated signals initiated by heat shock in partial roots of *Commelina communis* L. *Science in China Series C: Life Sciences* 49, 18-25
- Thordal-Christensen, H.; Zhang, Z.; Wei, Y.; Collinge, D. B. 1997. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal* 11, 1187-1194.
- Tucker C. C.; Chakraborty, S. 1997. Quantitative assessment of lesion characteristics and disease severity using digital image processing. *Journal of Phytopathology* 145: 273-278.