



Growth of *Rosmarinus officinalis* L. and acumulation of secondary metabolites under high salinity

Crecimiento de *Rosmarinus officinalis* L. y acumulación de metabolitos secundarios en alta salinidad

Becerra-Gudiño, A.^{1,2}, Juárez-Rosete, C. R.^{1,2}, Bugarín-Montoya, R.^{1,2}, Murillo-Amador, B.³.

Universidad Autónoma de Nayarit, ¹Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias,

²Unidad Académica de Agricultura, Carretera Tepic-Compostela Km. 9., C. P. 63780. Xalisco, Nayarit, México.

³Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Av. Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur; C. P. 23096, La Paz B. C. S. México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Becerra-Gudiño, A., Juárez-Rosete, C. R., Bugarín-Montoya, R., Murillo-Amador, B. (2019). Growth of *Rosmarinus officinalis* L. and acumulation of secondary metabolites under high salinity. *Revista Bio Ciencias* 6, e567. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e567>



ABSTRACT

Salinity impacts the development of crops and induces changes in secondary metabolism of aromatic and medicinal plants. Rosemary *Rosmarinus officinalis* L. is a plant of the Lamiaceae family with chemical compounds of important biological activity whose production can be induced. The objective of this work was to evaluate the vegetative growth and production of secondary metabolites in rosemary grown in shade house and greenhouse, with different salt concentrations in the culture medium. The experiment was conducted in two production environments, shade house and greenhouse, with hydroponic system. Concentrations of Steiner's nutrient solution of 75, 100, 640 and 870 % were used, in addition to the Steiner's nutrient solution of 75 % added with 75, 100 and 125 mM of NaCl. There were five repetitions. The plants were harvested

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: November 17th 2018.

Accepted/Aceptado: December 10th 2018.

Available on line/Publicado: March 22nd 2019.

RESUMEN

La salinidad impacta el desarrollo de los cultivos e induce cambios en el metabolismo secundario de plantas aromáticas y medicinales. El romero *Rosmarinus officinalis* L. es una planta de la familia Lamiaceae con compuestos químicos de importante actividad biológica, cuya producción puede ser inducida. El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento vegetativo y producción de metabolitos secundarios en plantas de romero cultivadas en casa sombra e invernadero, con diferentes concentraciones salinas en el medio de cultivo. El experimento se realizó en dos ambientes de producción con sistema hidropónico; se usaron concentraciones de la solución nutritiva de Steiner de 75, 100, 640 y 870 %, además de la solución nutritiva de Steiner al 75 % adicionada con 75, 100 y 125 mM de NaCl. Se tuvieron cinco repeticiones, la cosecha se realizó a los 18 y 36 días después del trasplante. Se determinó el contenido prolina con el método de Bates, el contenido de fenoles totales con el método de Folin-Ciocalteu y el índice de actividad antioxidante con el método DPPH. Los resultados indicaron que los

*Corresponding Author:

Andrea Becerra Gudiño, Universidad Autónoma de Nayarit, Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias de la Unidad Académica de Agricultura, Carretera Tepic-Compostela Km. 9., C. P. 63780. Xalisco, Nayarit, México. E-mail: andrea.becerra@uan.edu.mx

at 18 and 36 days after transplant. Proline content was determined with the Bates method, total phenolic content with the Folin-Ciocalteu method and the index of antioxidant activity with the DPPH method. The results indicate that the production environments and the composition of the nutrient solution impacted on the production of the secondary metabolites in rosemary. The production environments did not influence growth parameters of rosemary. However, the accumulation of proline, the content of total phenols and its antioxidant activity index were higher in plants grown in the greenhouse. The composition of the nutrient solution had an effect on all the variables.

KEY WORDS

Rosemary, salinity, protected environments, proline, phenols.

Introduction

Salinization generates annual millionaire losses and it is estimated that about one third of irrigated lands worldwide have been affected by this problem (Schwabe *et al.*, 2006; Shabala, 2013). Agricultural production tends to be difficult in soils with electrical conductivities above 4 dS m⁻¹, because several cultivated species are sensitive to salinity (Jenks & Hasegawa, 2005; Duarte *et al.*, 2013). This situation imposes new challenges for farmers who have to deal with ecosystems that vary in soil type and quality as well as availability and quality of water resources (Lamz & González, 2013). Salinity is one of the environmental factors that disrupt all or some of the biochemical processes in plants, which consequently limits the productivity and quality of agricultural crops throughout the world (Duarte *et al.*, 2013).

Flowers & Colmer (2008) suggested the cultivation of plants tolerant to salinity, called halophytes, as an alternative in order to diversify production and take advantage of agricultural areas affected by this problem. These plants, representing a maximum of 2 % of terrestrial species, have adapted different physiological, biochemical and molecular strategies associated with their performance in saline environments that allow them to survive and grow normally even when there are high concentrations of salts in their rhizosphere,

ambientes de producción y la composición de la solución nutritiva impactaron positivamente la producción de los metabolitos secundarios en romero. Los ambientes de producción no influenciaron parámetros de crecimiento del romero, sin embargo, la acumulación de prolina, el contenido de fenoles totales y su índice de actividad antioxidante fueron mayores en plantas cultivadas en invernadero. La composición de la solución nutritiva tuvo efecto sobre todas las variables.

PALABRAS CLAVE

Romero, salinidad, ambientes protegidos, prolina, fenoles.

Introducción

La salinización genera pérdidas millonarias anuales y se estima que cerca de un tercio de las tierras irrigadas a nivel mundial han sido afectadas por este problema (Schwabe *et al.*, 2006; Shabala, 2013). La producción agrícola tiende a ser difícil en suelos con conductividades eléctricas superiores a 4 dS m⁻¹, porque varias especies cultivadas como frijol o maíz son sensibles a la salinidad, debido a que esta perturba todos o algunos de los procesos bioquímicos en las plantas, lo que consecuentemente limita la productividad y la calidad de los cultivos agrícolas en todo el mundo (Jenks & Hasegawa, 2005; Duarte *et al.*, 2013). Esta situación impone desafíos nuevos para los agricultores, quienes tienen que desenvolverse en ecosistemas que varían en tipo y calidad de suelo así como en disponibilidad y calidad de recursos hídricos (Lamz & González, 2013).

Flowers & Colmer (2008) sugirieron como alternativa para diversificar la producción y aprovechar zonas agrícolas afectadas por salinidad, el cultivo de plantas tolerantes a esta condición denominadas halófitas, que representan como máximo el 2 % de las especies terrestres. Las halófitas han adaptado diferentes estrategias fisiológicas, bioquímicas y moleculares asociadas a su desempeño en medios salinos que les permiten sobrevivir y crecer con normalidad aun cuando en la rizosfera existan concentraciones de sales entre 5 y 20 dS m⁻¹ de EC (Parida & Das, 2005). El interés por las plantas aromáticas y medicinales ha incrementado porque de su metabolismo se obtienen compuestos que constituyen una fuente única de productos farmacéuticos, aditivos alimentarios, saborizantes, aromas, entre otros;

between 5 and 20 dS m⁻¹ of EC (Parida & Das, 2005). The interest in aromatic and medicinal plants has increased in recent years, because from their metabolism are obtained compounds that are a unique source of pharmaceutical products, food additives, flavorings, aromas, among others, with antioxidant, antiviral, antibacterial and anticancer properties (Ramakrishna & Ravishankar, 2011). *Rosmarinus officinalis* L. is distinguished for being a species well adapted to saline environments which has been classified as a plant moderately tolerant to salinity, whose production and commercialization is increasing due to its economic importance as an aromatic species for use in fresh and dry, seasoning, essence and its content of active ingredients (Westervelt, 2003; Miyamoto, 2008).

Salinity causes symptoms related to the irreversible inhibition of growth since it slows down and does not reach completion. As a result, the leaf area, the size of the plant and the accumulation of dry matter are smaller (Campos et al., 2011). It is reported that saline stress directly or indirectly inhibits cell division and elongation of the cells of the root organs, stems and leaves (Zidan et al., 1990).

The reduction of biomass is attributed, mainly, to the fact that salt stress affects the photosynthetic rate due to a low potential in the soil solution, ion toxicity and nutritional imbalances (Munns, 2002). On the other hand, it impacts the production and accumulation of secondary metabolites of medicinal and aromatic plants (Beretta et al., 2011; Jordán et al., 2013 and Zaouali et al., 2013). Rosmarinic acid is one of the main phenolic compounds found in the tissues of species of the Lamiaceae family, this is the reason why they are considered as a valuable source of these compounds; in general, all its extracts have a significant antioxidant activity (Trivellini et al., 2016).

Although the salinity in soils is not exclusively due to NaCl, research on the effect of different ion sources on the development of aromatic plants, as well as their effect on secondary metabolism, is scarce. Additionally, in many cases plant material in which biological properties of extracts of *Rosmarinus officinalis* L. had been determined has been in populations with little mention of the agronomic management they received, and given the importance of these compounds in both industry as well as for its beneficial effects on human health, it is important to understand the response of

con propiedades antioxidantes, antivirales, antibacteriales y anticancerígenas (Ramakrishna & Ravishankar, 2011). *Rosmarinus officinalis* L. se distingue por ser una especie bien adaptada a ambientes salinos, clasificada como una planta moderadamente tolerante a la salinidad, cuya producción y comercialización está en aumento por su importancia económica como especie aromática para uso en fresco y seco, condimento, esencia y por su contenido de principios activos (Westervelt, 2003; Miyamoto, 2008).

La salinidad provoca síntomas relacionados con la inhibición irreversible del crecimiento puesto que este se vuelve lento y no llega a completarse, como consecuencia el área foliar, la talla de la planta y la acumulación de materia seca son menores (Campos et al., 2011). Se reporta que el estrés salino inhibe directa o indirectamente la división celular y la elongación de las células de la radícula, tallos y hojas (Zidan et al., 1990).

La reducción de biomasa se atribuye, principalmente, a que el estrés salino repercute en la tasa fotosintética debido a un potencial bajo en la solución del suelo, toxicidad por iones y desbalances nutrimentales (Munns, 2002). Por otra parte, impacta en la producción y acumulación de metabolitos secundarios en plantas medicinales y aromáticas (Beretta et al., 2011; Jordán et al., 2013; Zaouali et al., 2013). El ácido rosmarínico es uno de los compuestos fenólicos principales encontrado en los tejidos de especies de la familia Lamiaceae, por lo que se consideran una fuente valiosa de estos compuestos; en general todos sus extractos tienen una actividad antioxidante significativa (Trivellini et al., 2016).

Aunque la salinidad en los suelos no se debe exclusivamente a NaCl, las investigaciones sobre el efecto de distintas fuentes de iones en el desarrollo de plantas aromáticas, así como su efecto en el metabolismo secundario son escasas. Adicionalmente, en muchos de los casos el material vegetal en el que se han determinado las propiedades biológicas de los extractos de *Rosmarinus officinalis* L. ha sido en poblaciones de las que poco se menciona el manejo agronómico que reciben, y dada la importancia de estos compuestos tanto en la industria como por sus efectos benéficos en la salud humana, resulta importante comprender la respuesta de la acumulación de estos compuestos en condiciones controladas que puedan favorecer su producción.

Con base en lo anterior el objetivo de la presente investigación fue evaluar el crecimiento vegetativo y

the accumulation of these compounds under controlled conditions that may favor their production.

Based on the above, the objective of the present investigation was to evaluate the vegetative growth and production of secondary metabolites in *Rosmarinus officinalis* L. grown in two protected environments and different salt concentrations in the nutrient solution.

Material and Methods

This research was developed during the period from April to June 2016 at Unidad Académica de Agricultura of the Universidad Autónoma de Nayarit, located at 21° 25' 36" latitude N and 104° 53' 28" longitude W, at 922 msnm, in a single unit Gothic multispan greenhouse covered with milky plastic with 30 % shadow and in a shade-enclosure macro-tunnel type covered with mesh of 35 % shade. Three-month-old rosemary plants of the "Arp" variety were grown in 20 x 20 black polyethylene containers with tezontle as substrate. A completely randomized experimental design with a 2 x 7 factorial arrangement was used. The factors evaluated were two production environments and seven salinity levels of the nutrient solution, generating a total of 14 treatments (Table 1). Five repetitions were made per treatment. The experimental unit consisted of a plant in a container. Each plant was manually irrigated with 250 mL every three days. The harvest of vegetative material was made in the morning, between 9 and 11 am, at 18 and 36 days after the beginning of the application of the nutritive solutions.

Two groups of variables were evaluated, with measurements at 18 and 36 days after transplant (DAT). The first group was plant height (cm) and branches·plant⁻¹, the following group of variables was formed by the proline content ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$), content of total phenols ($\mu\text{g CAE}/100\text{ g}$) and the antioxidant activity index (AAI) (% inhibition of DPPH).

Plant height was measured with a ruler based on the base of the plant and the apex of the main stem as the maximum height, while the number of branches·plant⁻¹ was counted from the base of the stem to the apical meristem.

Proline content was determined following the procedure of Bates *et al.* (1973), 0.5 g of pulverized lyophilized

producción de metabolitos secundarios en *Rosmarinus officinalis* L. cultivado en dos ambientes protegidos y diferentes concentraciones salinas en la solución nutritiva.

Material y Métodos

Esta investigación se desarrolló durante el periodo de abril a junio de 2016 en la Unidad Académica de Agricultura de la Universidad Autónoma de Nayarit, localizada a 21° 25' 36" latitud N y 104° 53' 28" longitud O, a 922 msnm, en un invernadero tipo gótico cenital de una nave cubierta con plástico lechoso con 30 % de sombra y en una casa sombra tipo macrotúnel con malla de 35 % de sombra. Se cultivaron plantas de romero de la variedad "Arp" de 3 meses de edad en contenedores de polietileno negro de 20 x 20 con tezontle como sustrato. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2 x 7. Los factores evaluados fueron dos ambientes de producción y siete niveles de salinidad de la solución nutritiva, generándose un total de 14 tratamientos (Tabla 1). Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento. La unidad experimental consistió de una planta en un contenedor, la cual se regó manualmente con 250 mL cada tres días. La cosecha de material vegetativo se realizó entre 9 y 11 a.m., a los 18 y 36 días después del inicio de la aplicación de las soluciones nutritivas.

Se evaluaron dos grupos de variables, con mediciones a los 18 y 36 días después del trasplante (DAT), el primer grupo fue altura de planta (cm) y ramas·planta⁻¹, el siguiente grupo de variables se conformó por el contenido de prolina ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$), contenido de fenoles totales ($\mu\text{g CAE}/100\text{ g}$) y el índice de actividad antioxidante (AAI) (% de inhibición de DPPH).

La altura de planta, se midió con una regla graduada en milímetros desde el cuello de la planta y como altura máxima el ápice del tallo principal. Además se contabilizó el número de ramas·planta⁻¹ desde la base del tallo.

El contenido de prolina se determinó con la metodología de Bates *et al.* (1973), para la cual se utilizaron 0.5 g de muestra liofilizada pulverizada que se maceró con 5 mL de ácido sulfosalicílico al 3 %; el extracto se filtró y después se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min. Se midió una alícuota de 2 mL del sobrenadante, que fueron dispuestos en un tubo de ensayo, a los cuales se les agregó 2 mL de ninhidrina ácida y 2 mL de ácido acético glacial. El blanco

Table 1.
Irrigation-solution composition for cultivation of *Rosmarinus officinalis* L. under shade-enclosure and greenhouse.

Tabla 1.
Composición de la solución de riego para el cultivo de *Rosmarinus Officinalis* L. bajo cubierta de sombra e invernadero.

Treatment	Description	Electric conductivity (+/dS m ⁻¹)
1	NS 75 % (Control, C)	1.80
2	NS 100 %	2.36
3	NS 640 %	10.90
4	NS 870 %	14.25
5	C + 75 mM NaCl	8.49
6	C + 100 mM NaCl	10.56
7	C + 125 mM NaCl	11.80

NS: Steiner's Nutrient Solution (1984).

NS: Solución Nutritiva de Steiner (1984).

sample were used, macerated with 5 mL of 3 % sulfosalicylic acid; the extract was filtered and then centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. An aliquot of 2 mL of the supernatant was measured and placed in a test tube then added 2 mL of acid ninhydrin and 2 mL of glacial acetic acid. The blank was prepared with 2 mL of sulfosalicylic acid, 2 mL of acid ninhydrin and 2 mL of glacial acetic acid. The standard curve was prepared with different concentrations of standard proline solution (20 $\mu\text{moles mL}^{-1}$); from this solution an aliquot of 1 mL was measured and deposited in a flask and adjusted to 50 mL with 3 % sulfosalicylic acid. The mentioned dilution is equivalent to 400 nmoles $\cdot\text{mL}^{-1}$. Each tube was vortexed until obtaining an emulsion. Then they were covered and placed in a double boiler for 60 minutes. When finished, they were submerged in cold water for 10 minutes. 4 mL of toluene were added to each tube and then vortexed. The upper phase was placed in a new tube and the absorbance reading was performed at 520 nm in a Thermo Scientific spectrophotometer (Model Spectronic 200, Massachusetts, USA).

The proline content is expressed in $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ of proline, based on the following equation:

$$\frac{Abs\ extract - blank}{Slope} * \frac{Vol\ extract}{Vol\ aliquot} * 1/FW$$

se preparó con 2 mL de ácido sulfosalicílico, 2 mL de ninhidrina ácida y 2 mL de ácido acético glacial. La curva estándar se preparó con diferentes concentraciones de solución estándar de prolina (20 $\mu\text{moles mL}^{-1}$); de esta solución se midió una alícuota de 1 mL, la cual se depositó en un matraz y se aforó a 50 mL con ácido sulfosalicílico al 3 %, dicha dilución equivale a 400 nmoles mL^{-1} . Cada tubo se agitó en vórtex hasta obtener una emulsión, se taparon y se colocaron a baño María durante 60 minutos, al terminar se sumergieron en agua fría durante 10 minutos. A cada tubo se le agregaron 4 mL de tolueno y se agitó en vórtex. La fase superior se colocó en un tubo nuevo y se realizó la lectura de absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific (Modelo Spectronic 200, Massachusetts, USA).

El contenido de prolina se expresa en $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de prolina, con base a la siguiente ecuación:

$$\frac{Abs\ extract - blank}{Slope} * \frac{Vol\ extract}{Vol\ aliquot} * 1/FW$$

Donde: Abs extract es la absorbancia obtenida del extracto, blank (expresado en absorbancia) y slope (expresada como absorbancia nmol^{-1}) determinadas por regresión lineal, Vol extract es el total del volumen del extracto, Vol aliquot es el volumen usado en el ensayo, FW (expresado en mg) es la cantidad de material vegetal en la que se

Where: Abs extract is the absorbance obtained from the extract, blank (expressed in absorbance) and slope (expressed as $\text{absorbance} \cdot \text{mmol}^{-1}$) determined by linear regression, Vol extract is the total volume of the extract, Vol aliquot is the volume used in the test, FW (expressed in mg) is the amount of plant material in which extraction was carried out. It is assumed that the Abs extract is within the linear range.

Total content of phenols and AAI were evaluated in fresh material. The samples were prepared according to the procedure of Chizzola *et al.* (2008) and Nourhene *et al.* (2009); 60 % methanol (v/v) was used, 2 g of fresh material were treated with 15 mL of solvent and the extraction was carried out at 4 °C for 24 h. The extract was then filtered to separate the particles of plant material and refrigerated at 4 °C until analysis.

The total content of phenols was determined with the Folin-Ciocalteu method, according to Chizzola *et al.* (2008) with some modifications proposed by Juárez *et al.* (2011). The reagents used were: caffeic acid, Folin-Ciocalteu reagent, sodium carbonate and ethanol. Aliquots of 0.5 mL of ethanolic extract, 1 mL of 95 % ethanol (v/v) were measured to which 5 mL of distilled water were added, and 0.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent diluted in distilled water 1:10. After 5 min, 1 mL of sodium carbonate solution in water (5 %, v/v) was added. The samples were shaken and maintained during 30 min in the dark, then the absorbance at 725 nm was measured in a Thermo Scientific spectrophotometer (Model Spectronic 200, Massachusetts, USA). The blank was prepared following the same procedure with ethanol. Different concentrations of caffeic acid in ethanol were used for the calibration curve. The total content of phenolic compounds in the extract was expressed in μg equivalents of caffeic acid (CAE) per 100 g of fresh plant material (FPM).

The AAI of the phenolic extract was determined with the DPPH method described by Chizzola *et al.* (2008) and Scherer & Texeira (2009). For each sample, an aliquot of 400 μL of the extract was measured and adjusted to 1 mL with 50 % methanol, then 1 mL of DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazil) (2.43×10^{-4} M) was added. The samples were placed in darkness for 30 min at room temperature; the absorbance against a blank was measured at 517 nm in a Thermo Scientific spectrophotometer (Model Spectronic 200, Massachusetts, USA). The blank consisted of 500

realizó la extracción. Se asume que la Abs extract está dentro del rango lineal.

El contenido total de fenoles y el AAI se evaluaron en material fresco. Las muestras se prepararon de acuerdo con el procedimiento de Chizzola *et al.* (2008) y Nourhene *et al.* (2009); se utilizó metanol al 60 % (v/v), 2 g de material fresco se trataron con 15 mL de solvente y la extracción se realizó a 4 °C por 24 h. Después el extracto se filtró para separar las partículas de material vegetal y se refrigeró a 4 °C hasta su análisis.

El contenido total de fenoles se determinó con el método Folin-Ciocalteu, de acuerdo con Chizzola *et al.* (2008) con algunas modificaciones propuestas por Juárez *et al.* (2011). Los reactivos empleados fueron: ácido cafeico, reactivo Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio y etanol. Se midieron alícuotas de 0.5 mL de extracto etanólico, 1 mL de etanol 95 % (v/v) a los que se agregaron 5 mL de agua destilada, y 0.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu diluido en agua destilada 1:10. Después de 5 min, se agregó 1 mL de solución de carbonato de sodio en agua (5 %, v/v). Las muestras se agitaron y se mantuvieron 30 min en oscuridad, después se midió la absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific (Modelo Spectronic 200, Massachusetts, USA). El blanco se preparó siguiendo el mismo procedimiento con etanol. Para la curva de calibración se usaron concentraciones diferentes de ácido cafeico en etanol. El contenido total de compuestos fenólicos del extracto se expresó en μg de equivalentes de ácido cafeico (CAE) por 100 g de material vegetal fresco (FPM).

El AAI del extracto fenólico se determinó con el método DPPH descrito por Chizzola *et al.* (2008) y Scherer & Texeira (2009). Por cada muestra, se midió una alícuota de 400 μL del extracto y se ajustó a 1 mL con metanol al 50 %, posteriormente se agregó 1 mL de DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidracilo) (2.43×10^{-4} M). Las muestras se colocaron en oscuridad por 30 min a temperatura ambiente; la absorbancia contra un blanco fue medida a 517 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific (Modelo Spectronic 200, Massachusetts, USA). El blanco consistió en 500 μL de Trolox, 500 μL de metanol y 1 mL del reactivo DPPH para obtener una decoloración total del radical. Como sustancia de referencia para la curva de calibración se midieron 2.5 mM de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,8-tetrametil-chromano-2-carboxílico) en metanol; las concentraciones para la curva fueron de 0.1 a 2 mM de trolox en 1 mL de metanol. La solución estándar de Trolox se preparó bajo las mismas condiciones. Los

μL of Trolox, 500 μL of methanol and 1 mL of DPPH reagent in order to obtain a total discoloration of the radical. As a reference substance for the calibration curve, 2.5 mM Trolox (6-hydroxy-2,5,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) in methanol was measured; the concentrations for the curve were 0.1 to 2 mM of trolox in 1 mL of methanol. The standard Trolox solution was prepared under the same conditions. The results are expressed in percentage of inhibition of DPPH, according to the following equation:

$$\% DPPH = \left(\frac{Absc - Absm}{Absc} \right) * 100$$

Where Absc is the absorbance value of the control, Absm is the absorbance value of the sample.

Analysis of variance of each factor and variable was performed with the statistical package SAS (SAS, Inst., 2007). The comparison of means was conducted by means of the Tukey test ($p < 0.05$).

Results and Discussion

The analysis of variance indicated significant differences at 18 DAT due to the effect of the environment on the height of the plant and highly significant differences in the number of branches-plant⁻¹. Significant differences were also obtained on the variables proline, total phenols and AAI due to the effect of the production environment, the nutrient solution and the interaction among them. The analysis of variance at 36 DAT did not indicate significant differences in the evaluated growth variables, except for plant height due to the effect of the environment interaction by nutrient solution. However, in all physiological variables evaluated, highly significant differences were found due to the effect of the environment, the nutritive solution and the environmental interaction by nutritive solution (Table 2).

Height. At 18 DAT, the highest averages were found in plants grown in the greenhouse (Table 3); In this regard, it is possible that the initial light intensity perceived in that environment has stimulated a greater accumulation of carbohydrates (Lambers *et al.*, 2008). However, the crop followed the same growing rate as long as the experiment was run in both production environments. When considering the effect of the nutrient solution on the height, the analysis of variance allows to observe a homogeneous growth at 18

resultados se expresan en porcentaje de inhibición de DPPH, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% DPPH = \left(\frac{Absc - Absm}{Absc} \right) * 100$$

Donde Absc es el valor de absorbancia del control, Absm es el valor de absorbancia de la muestra.

Se realizaron análisis de varianza de cada factor y variable con el paquete estadístico SAS (SAS, Inst., 2007). La comparación de medias fue mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Resultados y Discusión

El análisis de varianza indicó diferencias significativas a los 18 DAT para todas las variables. Así como en las variables prolinea, fenoles totales e AAI por efecto del ambiente de producción, la solución nutritiva y la interacción entre estos a los 36 DAT (Tabla 2).

Altura. A los 18 DAT, los mayores promedios se encontraron en las plantas cultivadas en invernadero (Tabla 3); al respecto, es posible que la intensidad luminosa inicial percibida en ese ambiente haya estimulado una acumulación mayor de carbohidratos (Lambers *et al.*, 2008). Sin embargo, el cultivo siguió un mismo ritmo de crecimiento durante el experimento en ambos ambientes de producción. Al considerar el efecto de la solución nutritiva sobre la altura, el análisis de varianza permitió observar un crecimiento homogéneo a los 18 y 36 DAT, los promedios oscilaron entre 32.22 y 35.05 cm respectivamente (Tabla 3 y 4). Estos valores son superiores a los reportados por Kiarostami *et al.* (2010) cuando usaron NaCl en el medio de cultivo; estas diferencias podrían atribuirse a la concentración subóptima de algunos nutrientes que acompañaron a los tratamientos con NaCl en este ensayo.

Número de ramas. Las plantas cultivadas en casa sombra obtuvieron los mayores valores a los 18 DAT. (Tabla 3). Esta respuesta inicial pudo haber sido influenciada por las condiciones de luz permitida por la malla de la cubierta y su efecto sobre la tasa de crecimiento, ya que la formación de hojas nuevas permite interceptar un mayor porcentaje de radiación (Silber & Bar-Tal, 2008). No obstante, a los 36 DAT no se observaron diferencias por efecto del ambiente (Tabla 4). Los resultados de esta variable fueron parecidos a la tendencia observada para la variable altura

Table 2.
Analysis of variance of evaluated variables on *Rosmarinus officinalis* L. cultivated in two environments and different nutrient solution composition.

Tabla 2.
Análisis de varianza de las variables evaluadas en *Rosmarinus officinalis* L. cultivado en dos ambientes y composición de diferentes soluciones nutritivas.

DAT	Source of variation	Plant height (cm)		Stem number (plant ⁻¹)		Proline (μmol/g)		Total phenolic content (μg CAE/100 g)		Antioxidant activity (% DPPH-inhibition)	
		DF	Pr>F	DF	Pr>F	DF	Pr>F	DF	Pr>F	DF	Pr>F
18	Environment	1	0.0014*	1	0.0001**	1	0.0001**	1	0.0385*	1	0.5930 ^{ns}
	NS	6	0.3474 ^{ns}	6	0.6948 ^{ns}	6	0.0001**	6	0.0197*	6	0.0001**
	Env*NS	6	0.9315 ^{ns}	6	0.9131 ^{ns}	6	0.0001**	6	0.0190*	6	0.0012*
		MSE	C.V.	MSE	C.V.	MSE	C.V.	MSE	C.V.	MSE	C.V.
		12.96	11.42	28.16	15.50	0.07	13.30	51.16	4.06	52.33	14.26
36	Environment	1	0.9587 ^{ns}	1	0.0955 ^{ns}	1	0.0400*	1	0.0287*	1	0.0001**
	NS	6	0.6038 ^{ns}	6	0.7317 ^{ns}	6	0.0001**	6	0.0001**	6	0.0001**
	Env*NS	6	0.0185*	6	0.3647 ^{ns}	6	0.0067*	6	0.0001**	6	0.0001**
		MSE	C.V.	MSE	C.V.	MSE	C.V.	MSE	C.V.	MSE	C.V.
		11.89	10.40	19.09	11.31	0.19	22.39	6.69	1.58	14.24	6.04

DAT: Days after transplanting, NS: Nutrient solution, Env *NS: Interaction between environment and nutrient solution, DF: Degrees of freedom, MSE: Mean square error, ^{ns}Not significant at $p \leq 0.05$. *Significant at $p \leq 0.05$, **Highly significant at $p \leq 0.01$, C.V.: Coefficient of variation (%).
DAT: Días después del trasplante, NS: Solución nutritiva, Env *NS: Interacción entre el medio ambiente y la solución de nutrientes, DF: Grados de libertad, MSE: Error cuadrático medio, ^{ns}No significativo a $p \leq 0.05$. *Significativo a $p \leq 0.05$, **Muy significativo a $p \leq 0.01$, C.V.: Coeficiente de variación (%).

Table 3.
Mean values for morphometric characteristics and content of secondary metabolites of rosemary grown in two environments and different nutrient solution composition at 18 days after transplanting.

Tabla 3.
Valores medios para las características morfométricas y el contenido de metabolitos secundarios de romero cultivado en dos ambientes y diferentes composiciones de solución nutritiva a los 18 días después del trasplante.

Source of variation	Plant height (cm)	Stem number (plant ⁻¹)	Proline (μmol/mg)	Total phenolic content (μg CAE/100 g)	Antioxidant Activity (% DPPH-inhibition)
Environment					
Shade-enclosure	30.066 b ^z	36.914 a	2.495 a	173.451 b	51.221 a
Greenhouse	32.949 a	31.571 b	1.567 b	178.244 a	50.180 a
Nutrient solution					
1. NS 75 % (Control)	31.950 a	34.300 a	0.183 d	169.908 a	63.296 a
2. NS 100 %	33.000 a	35.900 a	0.858 c	176.947 a	51.724 b
3. NS 640 %	33.150 a	35.800 a	3.143 a	174.645 a	37.868 c
4. NS 870 %	31.200 a	32.700 a	2.440 b	169.908 a	49.380 b
5. Control + 75 mM NaCl	30.120 a	34.900 a	2.290 b	174.974 a	50.124 b
6. Control + 100 mM NaCl	30.600 a	33.200 a	2.603 b	182.474 a	52.525 ab
7. Control + 125 mM NaCl	30.530 a	32.900 a	2.680 b	182.079 a	49.986 b

^zMeans with the same letter in a column do not differ (Tukey $\alpha = 0.05$), NS: Steiner's Nutrient solution (Steiner, 1984).

^zLas medias con la misma letra en una columna no difieren (Tukey $\alpha = 0.05$), NS: solución nutritiva de Steiner (Steiner, 1984).

Table 4.
Mean values for morphometric characteristics and content of secondary metabolites of rosemary grown in two environments and different nutrient solution composition at 36 days after transplanting.

Tabla 4.
Valores medios para las características morfométricas y el contenido de metabolitos secundarios de romero cultivado en dos ambientes y diferentes composiciones de solución nutritiva a los 36 días después del trasplante.

Source of variation	Plant height (cm)	Stem number (plant ⁻¹)	Proline (μmol/mg)	Total phenolic content (μg CAE/100 g)	Antioxidant Activity (% DPPH - inhibition)
Environment					
Shade-enclosure	33.129 a ²	37.743 a	1.810 b	162.154 b	57.932 b
Greenhouse	33.171 a	39.514 a	2.068 a	163.996 a	67.029 a
Nutrient solution					
1. NS 75 % (Control)	35.050 a	39.900 a	0.590 d	173.789 a	67.181 a
2. NS 100 %	33.340 a	38.700 a	1.060 cd	157.605 d	70.888 a
3. NS 640 %	32.220 a	36.800 a	3.305 a	167.079 b	44.944 b
4. NS 870 %	32.930 a	38.400 a	3.305 a	163.000 bc	41.476 b
5. Control + 75 mM NaCl	32.280 a	37.900 a	1.510 cd	158.987 cd	70.563 a
6. Control + 100 mM NaCl	33.350 a	39.000 a	1.432 bc	161.092 cd	71.970 a
7. Control + 125 mM NaCl	32.880 a	39.700 a	1.997 b	159.974 cd	70.340 a

²Means with the same letter in a column do not differ (Tukey $\alpha = 0.05$), NS: Steiner's Nutrient solution (Steiner, 1984).

²Las medias con la misma letra en una columna no difieren (Tukey $\alpha = 0.05$), NS: solución nutritiva de Steiner (Steiner, 1984).

and 36 DAT, the averages oscillated between 32.22 and 35.05 cm (Table 3 and 4). These values are higher than those reported by Kiarostami *et al.* (2010) when they used NaCl in the growing medium; these differences could be attributed to the suboptimal concentration of some nutrients that accompanied the NaCl treatments in this trial.

Number of branches. This variable was different between production environments at 18 DAT. The highest values were found in plants grown in shade-enclosure; however, at 36 DAT there were no differences observed due to environment effect (Table 3 and 4). The initial difference observed could had been influenced by the light conditions allowed by the cover of the shade-enclosure and its effect on the growing rate, since the formation of new leaves allows to intercept a greater percentage of radiation (Silber & Bar-Tal, 2008). No differences were observed due to the nutrient solution effect. The results of this variable were similar to the trend observed for the variable plant height.

In this work, it is partially demonstrated that *Rosmarinus officinalis* L. is a plant moderately tolerant to salinity as

de planta. En este trabajo se demuestra parcialmente que *Rosmarinus officinalis* L. es una planta moderadamente tolerante a la salinidad como lo indicaron Miyamoto (2008) y Tounekti *et al.*, (2008), ya que el estrés salino promovido por soluciones nutritivas adicionadas con NaCl con alta EC por 36 días de tratamiento, no redujeron el crecimiento.

Prolina. El contenido de prolina resultó diferente en las fechas de muestreo en ambos ambientes de producción. Las plantas de romero cultivadas en invernadero obtuvieron los mayores valores a los 36 con 2.067 μmol/g (Tabla 4). Lo que difiere de lo reportado para *Thymus vulgaris* donde se observó un incremento en condiciones de campo, en comparación con las condiciones de malla sombra, lo cual sugirió que las condiciones en el invernadero de alguna manera intensificaron el estrés inducido lo que estimuló una mayor síntesis de este metabolito (Zrig *et al.*, 2016). En diversas condiciones de estrés abiótico, además de actuar como osmolito, funciona como un chaperón molecular que conserva la integridad de proteínas y membranas, estabiliza el pH del citosol y neutraliza

indicated by Miyamoto (2008) and Tounekti *et al.*, (2008), since the saline stress promoted by nutritive solutions added with NaCl and high EC during 36 days of treatment did not reduce growth.

Proline. The proline content was different in the sampling dates in both production environments. Rosemary plants grown in the greenhouse recorded the highest proline content at 36 DAT with 2.067 $\mu\text{mol/g}$ (Table 4). These values differ from those reported in *Thymus vulgaris* L. where the proline content increased in field conditions compared to shade-enclosure conditions, which suggests that the conditions in the greenhouse somehow intensified the induced stress, which stimulated a greater synthesis of this metabolite (Zrig *et al.*, 2016). In addition to acting as osmolyte, under various conditions of abiotic stress, proline functions as a molecular chaperone that preserves the integrity of proteins and membranes, stabilizes the pH of the cytosol and neutralizes reactive oxygen species (Kishor *et al.*, 2005; Hayat *et al.*, 2012).

Due to the effect of the nutritive solution, statistical differences were observed at 18 and 36 DAT in the proline content (Table 3 and 4). During the period of the experiment, the lowest values in proline content were obtained in treatment 1, while the highest values were found in treatment 3 and 4 at 36 DAT (Table 4). The above indicates that the osmotic effect caused by NaCl is different from that caused by an excessive concentration of all the nutrients. Although the observed tendency of the proline to increase as the salinity increased coincided with other medicinal species when growing under high concentrations of NaCl, the proline values obtained in this research are higher than those reported in *Mentha piperita*, but lower than those of *Satureja hortensis* and *Matricaria chamomilla* (Roodbari *et al.*, 2013; Akbari *et al.*, 2013; Afzali *et al.*, 2009).

In conditions of salinity, plants need strategies to survive in hostile environments. One of the most efficient physiological mechanisms to survive stress conditions is osmotic adjustment in which tissues reduce their osmotic potential by accumulating a variety of metabolites which allow them to maintain turgor (Hayat *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013; Zrig *et al.*, 2016). At the beginning of the experiment, a progressive increase in the proline content was observed as the concentration of the nutrient solution increased. In addition, the decrease observed over time allows to infer that the age of the plant influences its ability to synthesize and regulate the concentration of this amino acid during the time that stress lasts (Xu *et al.*, 2014).

especies reactivas al oxígeno (Kishor *et al.*, 2005; Hayat *et al.*, 2012).

Por efecto de la solución nutritiva se observaron diferencias estadísticas a los 18 y 36 DAT en el contenido de prolina (Tabla 3 y 4). Durante el período del experimento, los valores menores en contenido de prolina se obtuvieron en el tratamiento 1 mientras que los valores mayores se encontraron en el tratamiento 3 y 4 a los 36 DAT (Tabla 4). Lo anterior indica que el efecto osmótico que puede ocasionar el NaCl, es diferente del originado por una concentración excesiva de todos los nutrientes. Aunque la tendencia observada de la prolina a incrementarse a medida que la salinidad aumentó coincidió con otras especies medicinales cuando se trabajó con altas concentraciones de NaCl; los valores de prolina obtenidos en esta investigación son superiores a los reportados en *Mentha piperita*, pero inferiores a los de *Satureja hortensis* y *Matricaria chamomilla* (Roodbari *et al.*, 2013; Akbari *et al.*, 2013; Afzali *et al.*, 2009).

En condiciones de salinidad, las plantas necesitan estrategias para sobrevivir en ambientes hostiles, uno de los mecanismos fisiológicos más eficientes para sobrevivir a condiciones de estrés, es el ajuste osmótico en el que los tejidos reducen su potencial osmótico mediante la acumulación de una variedad de metabolitos de tal manera que éstos les ayuden a conservar la turgencia (Hayat *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013; Zrig *et al.*, 2016). Al inicio del experimento se observó un incremento progresivo del contenido de prolina conforme la concentración de la solución nutritiva aumentó, adicionalmente, la disminución observada a través del tiempo permite inferir que la edad de la planta influyó en su capacidad de sintetizar y regular la concentración de este aminoácido durante el tiempo que dura el estrés (Xu *et al.*, 2014).

Contenido total de fenoles. Esta variable resultó diferente entre los ambientes de producción, donde las plantas de romero cultivadas en invernadero obtuvieron los valores mayores en los muestreos (163.996 – 178.244 $\mu\text{g CAE/100 g}$) (Tabla 3 y 4). Estos valores difieren de los señalados por Zrig *et al.* (2016), quienes reportaron un promedio de 6.46 mg ácido gálico g^{-1} PF en *Thymus vulgaris* L. cultivado en casa sombra, con un aporte de 500-700 $\text{mM m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR, éstas

Total content of phenols. This variable was different among production environments, where rosemary plants grown in the greenhouse obtained the highest values in the samples (163,996 - 178,244 $\mu\text{g CAE}/100\text{ g}$) (Table 3 and 4). These values differ from those of Zrig *et al.* (2016), who reported 6.46 mg gallic acid g^{-1} PF (average) of total phenols in *Thymus vulgaris* cultivated in shade house, with a contribution of 500-700 $\text{mM m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR. These last conditions of luminosity were similar to those recorded in greenhouse in this work, which suggests that total phenolic content could be sensitive to light. In this regard, Ghasemzadeh *et al.* (2010) observed that the variation of the radiation levels influences the accumulation and distribution of phenols in *Zingiber officinale* in which higher results were obtained with 460 - 790 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (34.16 - 39.06 mg gallic acid g^{-1} PS).

On the total phenolic content in rosemary plants, significant differences were observed from 36 DAT on, where the maximum value was reported in treatment 1 (173.789 $\mu\text{g CAE}/100\text{ g}$) and the minimum in treatment 2 (157.605 $\mu\text{g CAE}/100\text{ g}$) (Table 4). The values recorded in this work are higher than those of Chizzola *et al.* (2008) and Juárez *et al.* (2011) in *Thymus vulgaris* (65.1 and 68.05 $\mu\text{g CAE}/100\text{ g}$, respectively), which suggests that the cultivation of rosemary is a species with a high production of phenolic compounds that does not require the manipulation of the nutrient solution with excess of salts to obtain a higher total phenolic content in rosemary cultivation.

AAI. This variable was different from 36 DAT on, where rosemary plants grown in the greenhouse environment recorded the highest values (69.02 %) (Table 4). This response was possibly a function of the photosynthetically active radiation perceived in the environment. This trend is contrary to that reported by Ghasemzadeh *et al.* (2010) in extracts of *Zingiber officinale*, where a decrease in antioxidant activity was observed when the luminous intensity increased. Given the biological importance of this type of compounds and their role as antioxidants in human nutrition, the use of different controlled environments for their production should be considered.

Due to the effect of the nutrient solution, statistical differences were observed on the AAI of rosemary plants during the time the experiment lasted. At 36 DAT there were statistically significant differences for treatments 3 and 4 in comparison to the other treatments, which obtained the lowest values (44.9 and 41.4 %) (Table 4); In this regard, it is documented that salinity generates oxidative stress, which means it

últimas condiciones de luminosidad son similares a las registradas en condiciones de invernadero en este trabajo, lo que sugirió que el contenido de fenoles totales podría ser sensible a la luz. Al respecto, Ghasemzadeh *et al.* (2010) observaron que la variación de los niveles de radiación influyen en la acumulación y distribución de compuestos fenólicos en *Zingiber officinale* en el que se obtuvieron mayores resultados con 460 - 790 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (34.16 - 39.06 mg ácido gálico g^{-1} PS).

Por efecto de la solución nutritiva en el contenido total de fenoles en plantas de romero se observaron diferencias significativas a partir de los 36 DAT, donde el valor máximo se reportó en la solución nutritiva al 75 % (173.789 $\mu\text{g CAE}/100\text{ g}$) (Tabla 4). Los valores registrados en este trabajo son mayores a los reportados por Chizzola *et al.* (2008) y Juárez *et al.* (2011) en *Thymus vulgaris* (65.1 y 68.05 $\mu\text{g CAE}/100\text{ g}$, respectivamente); lo cual sugirió que no se requiere manipular la solución nutritiva con exceso de sales para obtener un contenido mayor de compuestos fenólicos en cultivo de romero.

AAI. Esta variable se mostró diferente a partir de los 36 DAT cuando las plantas de romero cultivadas en ambiente invernadero registraron los valores mayores (69.02 %) (Tabla 4). Es posible que esta respuesta estuviera en función de la radiación fotosintéticamente activa percibida en el ambiente. Esta tendencia es contraria a la reportada por Ghasemzadeh *et al.* (2010) en extractos de *Zingiber officinale* donde se observó una disminución de la actividad antioxidante al aumentar la intensidad luminosa. Dada la importancia biológica de este tipo de compuestos y su papel como antioxidantes en la nutrición humana, debe considerarse el uso de diferentes ambientes controlados para su producción.

Por efecto de la solución nutritiva se observaron diferencias estadísticas sobre el AAI de plantas de romero durante el tiempo que duró el experimento. A los 36 DAT se presentaron diferencias estadísticamente significativas al utilizar las soluciones nutritivas al 640 y 870 % con respecto a los demás tratamientos, lo cuales obtuvieron los valores menores (44.9 y 41.4 %) (Tabla 4); al respecto, está documentado que la salinidad acelera la oxidación de un sistema biológico mientras que los antioxidantes disminuyen los efectos adversos. Es posible que estos valores se encontraran debido al estrés oxidativo inducido por las concentraciones

accelerates the oxidation of a biological system; antioxidants reduce the adverse effects of reactive oxygen species. It is possible that these values were due to the oxidative stress induced by the high concentrations of all the nutrients present in the substrate solution, which stimulated a greater production of reactive oxygen species (Miller *et al.*, 2010).

In this investigation, *Rosmarinus officinalis* showed a decrease in the AAI as it increased the salinity of the growing medium, a trend similar to that observed by Kiarostami *et al.* (2010) and Oueslati *et al.* (2010), which tends to change significantly as it increases the concentration of the nutrient solution and has a differential response in terms of the salt that causes it. Treatment 1 was maintained with the highest percentages of inhibition, which was a stress-free condition, while the lower values were recorded in treatments 3 and 4 with 44.94 and 41.47 % (Table 3 and 4). However, the percentages of DPPH inhibition observed in this experiment were superior to those reported by Chizzola *et al.* (2008) (22-55 %) and Juárez *et al.* (2011) (43.88 %) in *Thymus vulgaris*. Because of its properties and structure, phenolic compounds are complex extracts that present an important antioxidant activity, which is given by the sum of the antioxidant capacities of each of its components, the interaction between them and the environment in which they are met. Eventually, potentiating or inhibiting effects may occur (Frankel & Meyer, 2000). The results obtained suggest that it is not advisable to induce saline stress in rosemary plants to produce antioxidant compounds of natural origin.

Conclusions

Neither the production environment, shade-enclosure or greenhouse, nor the formulation of the nutrient solution had any effects on the height of the plant and the number of branches of rosemary. The accumulation of proline in rosemary, the total phenolic content and the antioxidant activity index were highly influenced by the growing environment, being higher in the greenhouse.

The accumulation of proline was influenced by the composition of the nutrient solution, the highest values were obtained with the nutrient solution of Steiner at 640 and 870 %, while the total phenolic content and the antioxidant activity index were greater with the nutrient solution of Steiner at 75 %.

altas de todos los nutrientes presentes en la solución del sustrato, lo que estimuló una producción mayor de especies reactivas de oxígeno (Miller *et al.*, 2010).

En esta investigación, las plantas de *Rosmarinus officinalis* mostraron una disminución en el AAI conforme incrementó la salinidad del medio de cultivo, tendencia similar a la reportada por Kiarostami *et al.* (2010) y Oueslati *et al.* (2010). La cual tiende a cambiar de manera significativa a medida que incrementa la concentración de la solución nutritiva y tiene una respuesta diferencial en cuanto a la sal que la ocasiona, el tratamiento 1 se mantuvo con los mayores porcentajes de inhibición el cual fue una condición sin estrés, mientras que los valores menores se registraron en los tratamientos 3 y 4 con 44.94 y 41.47 %, respectivamente (Tabla 3 y 4). Sin embargo, los porcentajes de inhibición del DPPH observados en este experimento son superiores a los reportados por Chizzola *et al.* (2008) (22-55 %) y Juárez *et al.* (2011) (43.88 %) en *Thymus vulgaris*. Debido a sus propiedades y estructura, los compuestos fenólicos son extractos complejos que presentan una importante actividad antioxidante, la cual está determinada por cada uno de sus componentes, de la interacción entre ellos y del ambiente en el que se encuentran; eventualmente pueden producirse efectos potenciadores o inhibidores (Frankel & Meyer, 2000). Los resultados obtenidos permiten sugerir que no es recomendable inducir el estrés salino en plantas de romero para producir compuestos antioxidantes de origen natural.

Conclusiones

El ambiente de producción, casa sombra o invernadero y la formulación de la solución nutritiva no tienen efecto en la altura de planta y el número de ramas de romero. La acumulación de prolina en plantas de romero, el contenido total de fenoles y el índice de actividad antioxidante fueron mayores en invernadero.

La acumulación de prolina fue mayor con la solución nutritiva de Steiner al 640 y 870 %. Mientras que el contenido total de fenoles y el índice de actividad antioxidante fueron mayores con la solución nutritiva de Steiner al 75 %.

References

- Afzali, S. F., Shariatmadari, H. and Hajabbasi, M. A. (2009). Sodium chloride effects on seed germination, growth and ion concentration in Chamomile (*Matricaria chamomilla*). *Iran Agricultural Research*. 28(2): 107-118. https://hajabbasi.iut.ac.ir/sites/hajabbasi.iut.ac.ir/files/u140/41_sodium_chloride_effects_on_seed_germination_growth.pdf [Last checked August 22nd 2018].
- Akbari, S., Kordi, S., Fatahi, S. and Ghanbari, F. (2013). Physiological responses of summer savory (*Satureja hortensis* L.) under salinity stress. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 5(15): 1702-1708.
- Bates, L. E., Waldern, R. P. and Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. 39(1): 205-207. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00018060>
- Beretta, G., Artali, R., Facino M. R. and Gelmini, F. (2011). An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils. The case of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 55(5): 1255-1264. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.03.026>
- Campos, G., García, M., Pérez, D. and Ramis, C. (2011). Respuesta de 20 variedades de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) ante el estrés por NaCl durante la germinación y fase plantular. *Bioagro*. 23: 215-224. http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612011000300009
- Chizzola, R., Michitsch, H. and Franz, C. (2008). Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: Comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 6897-6904. <https://doi.org/10.1021/jf800617g>
- Duarte, B., Santos, D., Marques, J.C. and Caçador, I. (2013). Ecophysiological adaptations of two halophytes to salt stress: photosynthesis, PS II photochemistry and antioxidant feedback e Implications for resilience in climate change. *Plant Physiology Biochemistry*. 67: 178-188. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.004>
- Flowers, T. J. & Colmer, T. D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*. 179(4): 945-963. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02531.x>
- Frankel, E. & Meyer, A. (2000). The problems of using one dimensional methods to evaluate multidimensional food and biological antioxidants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 80(13): 1925-1941. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200010\)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200010)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4)
- Ghasemzadeh, A., Jaafer, H. Z. E., Rahmat, A., Wahab, P. E. M. and Halim M. P. A. (2010). Effect of different light intensities on total phenolic and flavonoids synthesis and anti-oxidant activities in young ginger varieties (*Zingiber officinale* Roscoe). *International Journal of Molecular Sciences*. 11: 3885-3897. <https://doi.org/10.3390/ijms11103885>
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J. and Ahmad, A. 2012. Role of proline under changing environments: A review. *Plant Signaling & Behaviour*. P1456-1466 <https://doi.org/10.4161/psb.21949>
- Jenks, M. A. & Hasegawa, P. M. (2005). *Plant Abiotic Stress*. India. Blackwell Publishing Ltd. 270 p. http://www.esalq.usp.br/lepse/imgs/conteudo_thumb/Plant-Abiotic-Stress-by-Matthew-A--Jenks--2005-.pdf
- Jordán, J. M., Lax, V., Rota, C. M., Lorán, S. and Sotomayor, J. A. (2013). Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Control*. 30: 463-468. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.029>
- Juárez, R. C. R., Craker, L. E., Rodríguez, M. M. N. and Aguilar, C. J. A. (2011). Humic substances and moisture content in the production of biomass and bioactive constituents of *Thymus vulgaris* L. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 34 (3): 183-188. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-73802011000300009&script=sci_abstract&lng=en
- Kiarostami, K., Mohseni, R. and Saboora, A. (2010). Biochemical changes of *Rosmarinus officinalis* under salt stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 6(3): 114-122. https://www.researchgate.net/publication/46137517_Biochemical_changes_of_Rosmarinus_officinalis_under_salt_stress
- Kishor, K. P. B., Sangam, S., Amrutha, R. N., Laxmi, P. S., Naidu, K. R., Rao, K. R. S. S., Rao, S., Reddy, K. J., Theriappan P. and Sreenivasulu, N. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Review Article*. 8(3): 424-438. <http://www.iisc.ernet.in/currsci/feb102005/424.pdf>
- Lambers, H. Chapin, III F. S. and Pons, T. L. (2008). *Plant physiological ecology. Second Edition*. Springer. Australia, USA, The Netherlands. 604 p. <https://www.springer.com/us/book/9780387783406>

- Lamz, P. A. & González, C. M. C. (2013). La salinidad como problema en la agricultura: La mejora vegetal una solución inmediata. *Cultivos Tropicales*. 34(4): 31-42. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362013000400005
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci, Y. S. and Mitter, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment*. 33: 453-467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x>
- Miyamoto, S. (2008). Salt tolerance of landscape plants common to the Southwest. Texas Water Resources Institute. <http://hdl.handle.net/1969.1/86110> [Last checked June 13rd 2018].
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*. 25:239-250. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>
- Nourhene, B., Bahloul, N., Slimen, I. B. and Kechaou, N. 2009. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial Crops and Products*. 29(2-3): 412-419. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.08.001>
- Oueslati, S., Karray-Bourouï, N., Attia, H., Rabhi, M., Ksouri, R. and Lachaal, M. (2010). Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 32(2): 289-296. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0406-0>
- Parida, A. K. & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60(3): 324-349. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.010>
- Ramakrishna, A. & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*. 6(11): 1720-1731. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
- Roodbari, N., Roodbari, S., Ganjali, A., Sabeghi, N. F. and Ansarifard, M. (2013). The effect of salinity stress on growth parameters and essential oil percentage of peppermint (*Mentha piperita* L.). *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*. 1(9): 1009-1015. http://www.ijabbr.com/article_7865.html
- Scherer, R. & Teixeira H.G. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*. 112(3): 654-658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026>
- Schwabe, K. A., Kan, I. and Knapp, K. C. (2006). Drainwater management for salinity mitigation in irrigated agriculture. *American Journal of Agricultural Economics*. 88(1): 135-149. <https://www.jstor.org/stable/3697971>
- Shabala, S. (2013). Review: Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Annals of Botany*. 112(7): 1209-1221. <https://doi.org/10.1093/aob/mct205>
- Silber, A. & Bar-Tal, A. (2008). Nutrition of substrate-grown plants in soilless culture: Theory and Practice. Elsevier. London, UK. pp 291-342. https://www.researchgate.net/profile/Avner_Silber/publication/236209014_Nutrition_of_Substrate-Grown_Plants/links/5a9cee3daca2721e3f322ab1/Nutrition-of-Substrate-Grown-Plants.pdf
- Steiner, A. A. (1984). The universal nutrient solution. Proceeding Sixth International Congress on Soilless Culture. Wageningen. The Netherlands. P. 633-650. [https://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455qlt3d2q\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1833796](https://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1833796)
- Tounekti, T., Vadel, A. M., Bedoui, A. and Khemira, H. (2008). NaCl stress affects growth and essential oil composition in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 83(2): 267-273. <https://doi.org/10.1080/14620316.2008.11512379>
- Trivellini, A., Lucchesini, A., Maggini, R., Mosadegh, H., Villamarin, T. S. S., Vernieri, P., Mensuali-Sodi, A. and Pardossi, A. (2016). *Lamiaceae* phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of "positive-stress". *Industrial Crops and Products*. 83: 241-254. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.039>
- Westervelt, P. (2003). Effect of growing medium and irrigation rate on growth of *Rosmarinus officinalis*. M.Sc. Thesis. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia. 51 p. <https://pdfs.semanticscholar.org/703c/a797a21fff5f35c6eee6a98dc4502af1250e.pdf>
- Wu, D., Cai, S., Chen, M., Ye, L., Chen, Z., Zhang, H., Dai, F., Wu, F. and Zhang, G. (2013). Tissue metabolic responses to salt stress in wild and cultivated Barley. *Plos One*. 8(1): 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055431>
- Xu, H. M., Tam, N. F. Y., Zan, Q. J., Bai, M., Shin, P. K. S., Vrijmoed, L. L. P., Cheung, S. E. and Liao, W. B. (2014). Effect of the anatomical features and physiology of a semi-mangrove plant *Myoporum bontioides*. *Marine Pollution Bulletin*. 85(2): 738-746. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.04.003>
- Zaouali, Y., Chograni, H., Trimech, R. and Boussaid, M. (2013). Changes in essential oil composition and phenolic fraction

- in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*. 43: 412–419. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.044>
- Zidan, I., Azaizeh, H. and Newman, P.M. (1990). Does salinity reduce growth in maize root epidermal cells by inhibiting their capacity for cell wall acidification. *Plant Physiology*. 93(1): 7–11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16667468>
- Zrig, A., Tounekti, T., AbdElgaward, H. Hegab, M. M., Ali, S. O. and Khemira, H. (2016). Essential oils, amino acids and polyphenols changes in salt-stressed *Thymus vulgaris* exposed to open-field and shade enclosure. *Industrial Crops and Products*. 91: 223-230. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.012>