

## Evaluación de la actividad enzimática antioxidante en *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184, durante el proceso de organogénesis en condiciones de estrés salino

### Evaluation of the anti-rust enzymatic activity in *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184, during the organogenesis process under conditions of saline stress

Leticia Fuentes Alfonso<sup>1</sup>, Yunel Pérez Hernández<sup>1</sup>, Amalia Domínguez Suárez, Anesio Mesa Sardiñas<sup>2</sup>, Sergio González Suárez<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". CP: 44740, e-mail: [leticia.fuentes@umcc.cu](mailto:leticia.fuentes@umcc.cu), [yunel.perez@umcc.cu](mailto:yunel.perez@umcc.cu), [amalia.dominguez@umcc.cu](mailto:amalia.dominguez@umcc.cu)

<sup>2</sup> Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey, Perico, Matanzas. E-mail: [anesio.mesa@indio.atenas.inf.cu](mailto:anesio.mesa@indio.atenas.inf.cu)

<sup>3</sup> Facultad de Biología, Universidad de La Habana. CP10400 e-mail: [sjglez@fbio.uh.cu](mailto:sjglez@fbio.uh.cu)

**RESUMEN.** *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 es una leguminosa forrajera promisoría para la explotación ganadera de suelos ácidos y afectados por acidez. El trabajo tuvo como objetivos, determinar los niveles de tolerancia a la salinidad durante la germinación *in vitro*, así como evaluar la respuesta organogénica y enzimática de diferentes explantes (hipocótilos, hojas cotiledonales y hojas verdaderas) sometidos a callogénesis en diferentes concentraciones de NaCl (0-100 mM). En ambos ensayos se realizó determinación de actividad enzimática de catalasas y peroxidasas, así como contenido de carbohidratos totales y de proteínas. El mayor porcentaje de germinación se produjo entre 10-20 mM/L; disminuyendo progresivamente para concentraciones mayores de cloruro de sodio. Se detectó incremento en la actividad enzimática tanto de catalasas como de las peroxidasas, en la medida que aumentó la concentración salina en el medio de germinación; sin embargo, durante el proceso de callogénesis, las actividades enzimáticas de ambas enzimas disminuyeron para concentraciones mayores que 50 mM. En todas las variantes de salinidad fue posible obtener callos, aunque mostraron diferencias en cuanto a textura y coloración dependiendo de la concentración salina del medio.

**Palabras clave:** Actividad enzimática, CIAT 184, organogénesis, salinidad, *Stylosanthes guianensis*.

**ABSTRACT.** *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 is a promising forage legume for poor and acid soils using for cattle production. In this research were determined the tolerance levels to salinity during *in vitro* seedling, thus was evaluated the organogenic response and the enzymatic activity of different explants (hypocotyls, cotyledons leaves and leaves) in a callogenic medium supplied with different NaCl levels (0-100 mM). The peroxides and catalases enzymatic activities were determined in both assays, as well as the total carbohydrates and proteins. The highest germination percentage was found between 10-20 mM/L of NaCl; a progressive diminishing of germination percentage was observed as NaCl concentration was increased. During germination assay, was determined an increase in the enzymatic activities of both catalases and peroxidases according the NaCl increasing levels, but in callogenic process the activities diminished after 50 mM of NaCl. It was possible to obtain callus in all treatments used, although the callus showed some differences in texture and colour according to the medium salt concentration.

**Key words:** Enzymatic activity, CIAT 184, organogenesis, salinity, *Stylosanthes guianensis*.

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de los suelos destinados a la ganadería en Cuba y en el mundo, normalmente presentan muchas limitaciones entre las que se destacan la salinidad, pedregosidad, acidez y baja fertilidad, lo que ha impulsado estrategias encaminadas a la introducción y evaluación de nuevos cultivares que puedan contribuir al mejoramiento de la calidad de

los suelos y el pasto. Entre ellos se encuentra *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT 184, leguminosa forrajera capaz de desarrollarse en suelos pobres y ácidos, considerada por algunos autores (González *et al.*, 2000) como moderadamente tolerante a la salinidad.

Numerosos estudios en plantas demuestran que la mayoría de los factores abióticos estresantes como

el salino (Hernández *et al.*, 1994; Sairam y Tyagi, 2004) provocan una superproducción de especies reactivas del oxígeno como los radicales superóxido ( $O_2^-$ ),  $H_2O_2$ , y el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ) en células vegetales. La tolerancia de diferentes especies a estreses ambientales es usualmente correlacionada con un eficiente sistema antioxidante, que comprende un grupo de enzimas detoxificadoras (superóxido dismutasa, catalasas y peroxidasas, fundamentalmente) y antioxidantes no enzimáticos.

Por otra parte, Zhu (2001) sugiere la posibilidad de obtener plantas con mayores niveles de tolerancia a la salinidad mediante el cultivo reiterado en estas condiciones dada la posibilidad de existencia de

genes de tolerancia en todas las plantas. La lentitud de los trabajos de mejora genética por métodos convencionales, poco aplicables al género *Stylosanthes*, apuntan hacia la utilización combinada de métodos biotecnológicos y selectivos, como el cultivo *in vitro* utilizado en este grupo (Consoli *et al.*, 1996; Quecini *et al.*, 2000).

El trabajo tuvo como objetivos: la determinación de los niveles de tolerancia a la salinidad durante la germinación *in vitro* de *Stylosanthes guianensis* CIAT, así como la evaluación de la respuesta organogénica y enzimática *in vitro* bajo estrés salino.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ensayo I. Germinación *in vitro* en condiciones salinas

Se utilizaron semillas de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. cv. CIAT-184, suministradas por el banco de germoplasma de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey, las cuales estaban almacenadas desde 1997. Las semillas fueron lavadas con detergente 1 g/L, después se esterilizaron por inmersión secuencial en etanol al

70 % durante un minuto, hipoclorito de sodio al 5 % y 1 % durante 10 y 15 minutos, respectivamente, seguidos por enjuagues sucesivos con agua destilada y estéril, aplicándose como método de escarificación el último enjuague con agua destilada estéril a 80 °C, durante 2 minutos (Skerman *et al.*, 1991). Las semillas fueron sembradas en tubos de ensayo con un sustrato inerte formado por algodón estéril humedecido con 10 mL de solución salina con diferentes concentraciones de NaCl (Tabla 1).

**Tabla 1. Concentraciones de NaCl utilizadas en el ensayo de estrés salino y los valores correspondientes a la conductividad eléctrica de la solución**

	Variantes de salinidad (NaCl)								
	1	3	5	7	9	10	11	12	13
mM	0	10	20	30	40	50	60	80	100
EC(mS)	5,38	6,33	7,29	8,02	9,03	9,60	11,5	13,6	14,2

### Ensayo II. Inducción de callogénesis

Plántulas de un mes de germinadas en sustrato inerte humedecido (algodón embebido en agua destilada estéril) fueron seccionadas en fragmentos de 10 mm aproximadamente, de sus hipocótilos, hojas cotiledonales y hojas verdaderas. Estos se colocaron en frascos de cristal con 30 mL de medio MS solidificado con 7 g/L de agar, 20 g/L de sacarosa, 2,4-D (1 mg/L), dos variantes de 6 BAP (2 y 4 mg/L), y varias concentraciones de NaCl (0 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM y 100 mM).

### Determinación de la actividad enzimática de catalasas y peroxidasas en plántulas germinadas y callos inducidos en condiciones de salinidad

Para los ensayos de actividad enzimática se eliminaron los restos de agar de las raíces de las plántulas y de los callos. Todos fueron pesados y macerados en frío con buffer Tris pH=8,2, seguido por la centrifugación a 5 000 rpm durante 10 minutos en frío. La actividad enzimática de catalasas se realizó por determinación espectrofotométrica (Ultrospect 2000) a 240 nm, de la descomposición

de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 20 mM de buffer fosfato de sodio pH = 7,0 (Chance y Machley, 1955), en un volumen final de 3 mL. Se realizaron tres mediciones por muestra.

Para la actividad de peróxidasas la reacción se adicionó en una cubeta de cuarzo 2,80 mL de solución tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0; 50 mL de solución guaiacol 0.018 M; 50 mL solución de peróxido de hidrógeno ajustado a una absorbancia a 240 nm (0,040-0,045) utilizando agua como blanco. A la mezcla reaccionante se adicionaron 100 mL del extracto vegetal. La actividad enzimática se realizó a 25 °C y a una longitud de onda de 436 nm. Se tomaron tres mediciones por muestra en un espectrofotómetro. (Ultrospect 2000)

Además, se realizó determinación de carbohidratos totales por el método de fenol-sulfúrico descrito por Dubois *et al.* (1956), mientras las proteínas fueron

detectadas por el de Lowry *et al.* (1951).

En ambos experimentos se utilizó un diseño completamente aleatorizado con diez tubos por tratamiento y tres réplicas. Se determinó el porcentaje de germinación de las plántulas a los 15 y 30 días de montado el experimento. Las medias de la actividad enzimática de ambas enzimas en el ensayo de salinidad fueron comparadas después de determinar si se ajustaban a una distribución normal mediante Test de Bondad de Ajuste Kolmogorov-Smirnoff y Test de Bartlet para Homogeneidad de Varianza (Sigarroa, 1985). A partir de esos resultados se aplicó ANOVA de clasificación simple y Test de Duncan para comparación de medias en el análisis de la actividad de germinación. Los datos de calogénesis fueron procesados por ANOVA de clasificación múltiple.

Los datos obtenidos fueron procesados por paquete Statgraphis Plus 6 sobre WINDOWS XP.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Determinación de la tolerancia a salinidad

Al comparar el número de plántulas germinadas bajo las condiciones diseñadas, se determinó un rango

óptimo para la germinación entre 10-20 mM de cloruro de sodio, resultando incluso más favorecida la germinación que en el control (0 mM NaCl) (Figura 1).

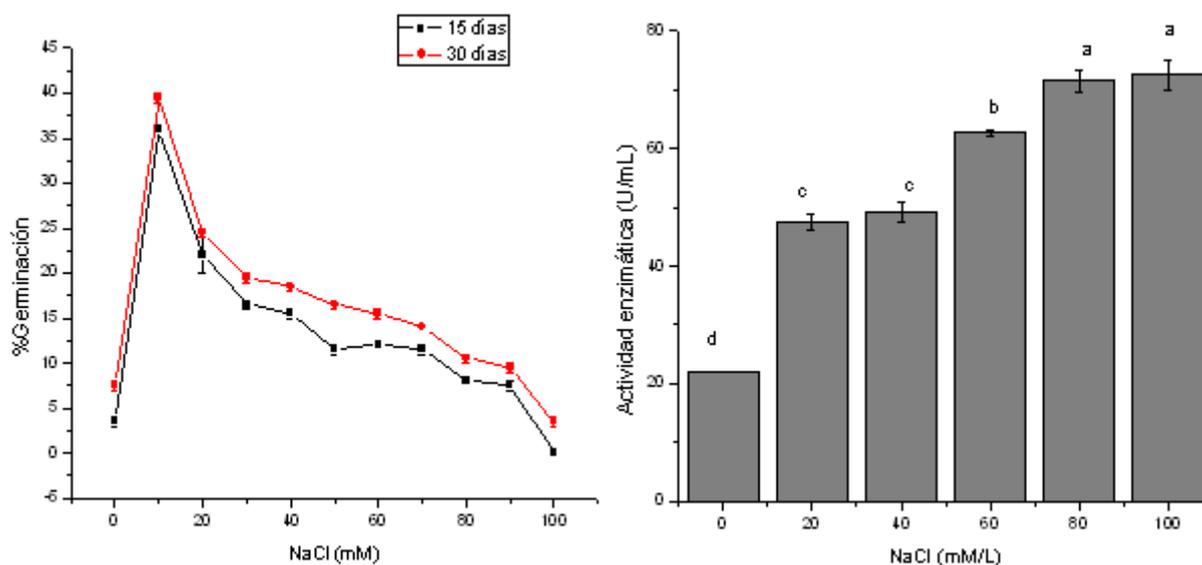


Figura 1. Evaluación de la germinación de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 en diferentes concentraciones de cloruro de sodio. A: porcentaje de germinación. B: Actividad enzimática de peroxidadas. Letras diferentes indican diferencias significativas según Test de rangos múltiples de Duncan  $p < 0,05$

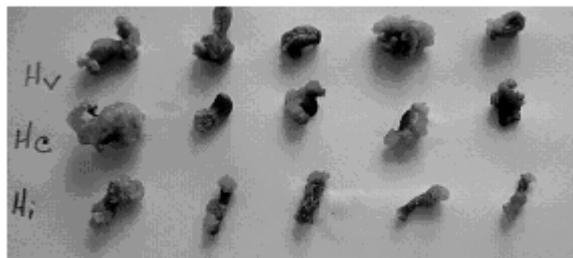
Este resultado pudiera estar dado por una entrada de iones sodio y cloruro hacia el interior de la semilla, creando un gradiente osmótico favorable para un proceso de imbibición más rápido y, por tanto, un mayor porcentaje de germinación. Por otra parte, concentraciones moderadas de NaCl podrían favorecer los procesos metabólicos intracelulares en el desarrollo de las plántulas.

A 0,1 M NaCl, la germinación resultó muy lenta, observándose daños en el desarrollo de las raíces. Es interesante señalar que las semillas llegan a germinar incluso pasados dos meses de estar sembradas en la mayor concentración, aunque su sistema radicular se afecta posteriormente.

La actividad enzimática para las enzimas evaluadas se incrementó en la medida que aumentaba la concentración salina. Trabajos realizados por Baky (2003), en experimentos con tres variedades de *Allium cepa*, sometidas a estrés salino, reportaron incrementos significativos en las actividades SOD, peroxidasa y catalasa.

### Inducción de callogénesis

Los explantes comienzan a engrosarse y a formar masas de tejido blanquecino en los bordes donde se realizó el corte, aproximadamente a la semana de cultivo (figura 2).

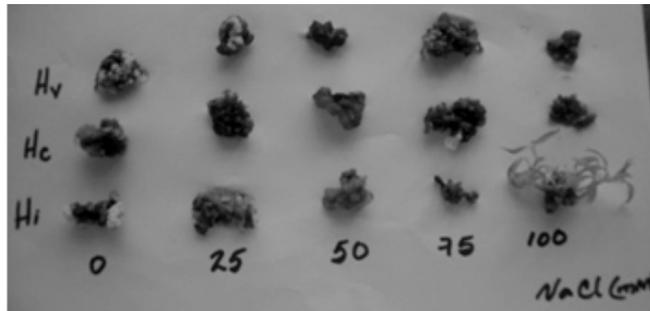


0 25 50 75 100 (NaCl mM)

**Figura 2.** Formación de callos en diferentes explantes de *Stylosanthes guianensis* CIAT 184 en condiciones de salinidad. Hi: hipocótilos, Hc: Hojas cotiledonales, Hv: Hojas verdaderas.

A los 15 días de siembra en la superficie vegetal de todos los explantes se pueden apreciar masas callogénicas, de textura y coloración variables en relación con la variante de cultivo, pues en la medida que aumenta la concentración los callos tienden a ser más sueltos o friables, según clasificación de

Pierik (1990) y tonos más oscuros. Ya a los 30 días se pueden apreciar señales organogénicas, fundamentalmente en las variantes de mayores concentraciones salinas (Figura 3).



**Figura 3.** Callos de *Stylosanthes guianensis* cv CIAT-184, luego de 30 días de cultivo de los explantes en medio de inducción suplementado con diferentes concentraciones de NaCl. Hi: hipocótilos, Hc: Hojas cotiledonales, Hv: Hojas verdaderas

El género *Stylosanthes* (Aubl.) Sw., está reconocido como un modelo de regeneración *in vitro* vía organogénica, en estudios realizados por varios autores (Consoli, 1996; Quecini *et al.*, 2000; Fuentes *et al.*, 2005), en los que se han evaluado la interacción entre explantes, reguladores del crecimiento, cultivares o accesiones, pero no el efecto de la salinidad.

Otro detalle interesante está relacionado con la desintegración completa que sufren los explantes Hc y Hv en la variante 5 suplementada con 100 mM de NaCl, los cuales se convierten en estructuras organogénicas sueltas sin conexión aparente entre ellas, lo cual hace sospechar un proceso embriogénico que debe ser comprobado histológicamente, y reportado como difícil de obtener en este género. De comprobarse este hecho, pudiera constituir una tarea a evaluar en futuros estudios.

### Actividad enzimática de peroxidasas y catalasas

Al evaluar la actividad enzimática tanto de peróxidasas como de catalasas, en callos de 21 días de formados, se denota aumento de las mismas hasta 50 mM de NaCl, cayendo ligeramente para valores superiores.

En relación con las peroxidadas las diferencias estadísticamente significativas estuvieron relacionadas con el factor variante de salinidad (figura 4), mientras en la actividad de catalasas, las diferencias estuvieron influidas por el efecto del explante a partir del cual se formó el callo. (figura 5)

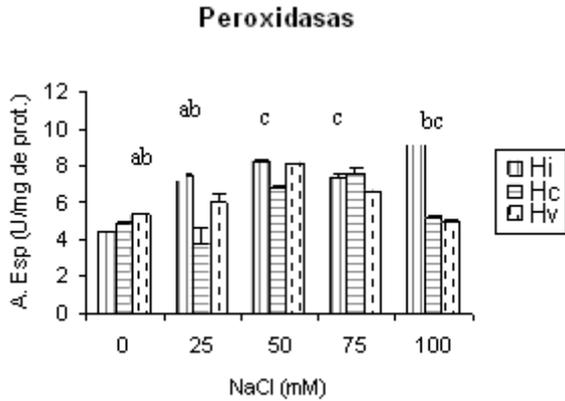


Figura 4. Actividad enzimática de peroxidadas en callos de *Stylosanthes guianensis* cv CIAT-184. Letras diferentes indican diferencias significativas según Test de rangos múltiples de Duncan  $p < 0,05$

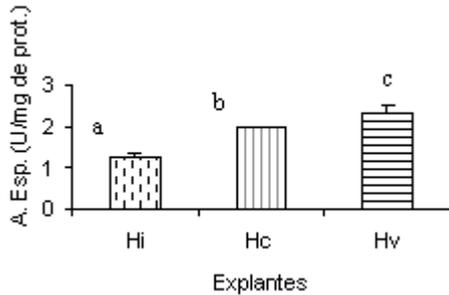


Figura 5. Actividad enzimática de catalasas en callos de *Stylosanthes guianensis* cv CIAT-184. Letras diferentes indican diferencias significativas según Test de rangos múltiples de Duncan  $p < 0,05$ .

Mientras las proteínas mantuvieron un comportamiento homogéneo para la mayoría de los tratamientos, no sucedió lo mismo con los carbohidratos totales, los cuales mostraron un incremento para las concentraciones mayores de salinidad en todos los casos. (figura 6)

Entre los mecanismos que desarrollan las plantas para responder a condiciones estresantes del medio, Sairam y Tyagi (2004), refieren la activación de mecanismos enzimáticos entre los que se encuentran la catalasa y la peroxidasa en respuesta a la producción de sustancias reactivas del oxígeno como

reacción secundaria al estrés salino. Trabajos realizados en trigo (Sairam y Srivasgrava, 2002) y en chícharo (Hernández *et al.*, 2003) reflejan diferencias en la respuesta enzimática entre variedades tolerantes y susceptibles, en las que apenas se denotaban cambios.

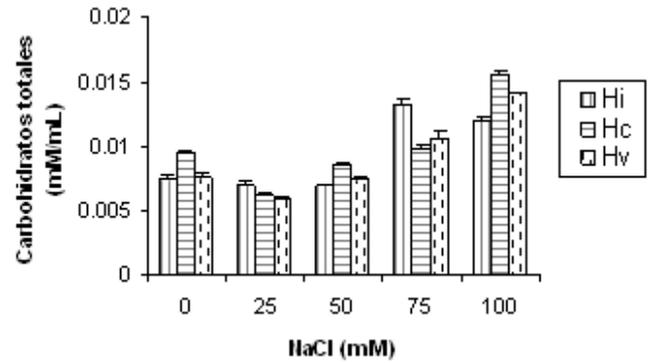


Figura 6. Contenido de carbohidratos totales en callos de *Stylosanthes guianensis* CIAT-184, de 21 días de inducidos en diferentes condiciones de salinidad

## CONCLUSIONES

1. El mayor porcentaje de germinación de semillas de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 en condiciones de salinidad se alcanza entre los 10 y 20 mM, aunque las semillas son capaces de germinar hasta en 100 mM de NaCl, manifestándose incrementos en la actividad enzimática de peroxidadas.
2. Es posible obtener callos organogénicos en condiciones de salinidad a partir de hipocótilos, hojas cotiledonales y hojas verdaderas, en los cuales se detectan cambios en la actividad enzimática de peroxidadas y catalasas como mecanismos antiestrés.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Baky, A.: "Influence of Salinity on Lipid Peroxidation, antioxidant Enzymes and Electrophoretic Patterns of Protein and Isoenzymes in Leaves of Some Onion Cultivars," *Asian Journal of Plant Sciences* 2 (8): 633-638, 2003, ISSN 1682-3974.
2. Chance, B. and A. Machley: "Assays of catalases and peroxidases," *Methods Enzymol.* 2, 764-775, 1995.

3. Consoli, L.; M. L. C. Vieira; C. Jr. Lopes de Souza and A. A. F. Garcia: "Tissue culture effects on quantitative traits in *Stylosanthes guianensis* (Leguminosae)," *Brazilian Journal of Genetics*. 19(3): 469-474, 1996.
4. Dubois, M. K.; A. Gilles; J. K. Hamilton; P.A. Rebbers & Smith, F.: "Colorimetric methods for determination of sugar and related substances," *Anal. Chem.* 28, 350-356, 1956.
5. Duncan, D. B.: Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 11: 1-42, 1955.
6. Fridovich, I.: Superoxide dismutase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 58, 61-97, 1986.
7. Fuentes, L.; M.L. Ruiz; M.I. Peláez de Lucas; A. Mesa y M. Fernández: *Pastos y Forrajes*, 28(5): 199-206, 2005.
8. González, L. M.; R. C. López; I. Fonseca y R. Ramírez: *Pastos y Forrajes*. 4: 299-308, 2000.
9. Hernandez, J.A. Del Rio and F. Sevilla: "Salt stress induced changes in SOD isozyme in leaves and mesophyll protoplasts from (*Vigna unguiculata* L.) Walp.," *New Physiologist*, 126: 37-44, 1994.
10. Lowry, O. H.; N. J. Rosebrough; A. L. Farr & R. Randal: "Protein measurements with de Folin phenol reagent," *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.
11. Sairam, R. K. and A. Tyagi: "Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants," *Current Science* 86(3): 407-421, 2004.
12. Sairam, R.K and G. CF. Srivasgrava: "Changes in antioxidant activity in subcellular fraction of tolerant and susceptible weath mecotypes in response to long-term salt stress," *Plant Sci.* 162: 897-904.
13. Skerman, P.J.: D. F. Cameron and D.G. Riveros: *Leguminosas forrajeras tropicales. Colección FAO: Producción y protección vegetal. N° 2. Impreso en Italia, 707 pp., 1991.*
14. Zhu, J. K.: "Plant salt tolerance," *Trends Plant Sci.* 6:66-71, 2001.

Recibido: 15/Junio/2007

Aceptado: 14/Septiembre/2007