

Respuesta fisiológica y bioquímica de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 y *Centrosema molle* al estrés por cloruro de sodio

Physiological and biochemical response of *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 and *Centrosema molle* to sodium chloride stress

Leticia Fuentes¹, Y. Pérez¹, Silvia Alemán¹, Daynet Sosa², Maryla Sosa¹, S. González³,

D. Infante², Diamarys Domínguez² y A.R. Mesa⁴

¹Centro de Estudios Biotecnológicos. Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos", Cuba

E-mail: leticia.fuentes@umcc.cu

²Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Caracas, Venezuela

³Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

⁴EEPF "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba

Resumen

Se realizó un estudio sobre el efecto de diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) en plántulas de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 y *Centrosema molle*, cultivadas en tierra vegetal. A los 15 días posteriores al tratamiento se determinaron la masa fresca, la masa seca, la relación raíz-brote y la distribución de la biomasa, así como la concentración de fenoles solubles, ligados a la pared y totales, además de la clorofila *a*, *b* y total. En ambos cultivares las raíces fueron los órganos más afectados con relación a la masa fresca y hubo un decrecimiento de la masa seca a elevadas concentraciones de NaCl. La relación raíz-brote mostró un aumento a 200 mM de NaCl en *S. guianensis*, mientras que no se observaron cambios significativos en *C. molle*. En la medida que la concentración de NaCl se elevó, la concentración de fenoles solubles aumentó sensiblemente en las raíces de ambas especies, así como los fenoles totales; mientras que en las hojas sólo se observaron aumentos en los niveles de fenoles solubles en *S. guianensis*. La concentración de clorofila *a* y total disminuyó significativamente a 200 mM de NaCl en ambos cultivares con relación al control. Los niveles de clorofila *b* disminuyeron en *C. molle* a 200 mM y se mantuvieron constantes en *S. guianensis*. El índice de estabilidad clorofílica mostró diferencias altamente significativas en *C. molle* (-8,154 y 269,1 para 100 y 200 mM de NaCl), a diferencia de *S. guianensis* que presentó una mayor estabilidad (20,47 y 31,37). La relación clorofila *a/b* decreció en *Centrosema* y no se observaron diferencias entre los tratamientos en *Stylosanthes*.

Palabras clave: *Centrosema molle*, clorofilas, compuestos fenólicos, salinidad, *Stylosanthes guianensis*

Abstract

A study was conducted on the effect of different concentrations of sodium chloride (NaCl) on seedlings of *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 and *Centrosema molle*, cultivated on topsoil. Fifteen days after the treatment fresh mass, dry mass, root/shoot ratio and biomass distribution were determined, as well as the concentration of soluble phenols, cell wall-bound phenols and total phenols, in addition to chlorophyll *a*, *b* and total chlorophyll. In both cultivars the roots were the most affected organs regarding fresh mass and there was a decrease of dry mass at high concentrations of NaCl. The root/shoot ratio showed an increase at 200 mM of NaCl in *S. guianensis*, while no significant changes were observed in *C. molle*. As the concentration of NaCl increased, the concentration of soluble phenols increased noticeably in the roots of both species, as well as total phenols; while in the leaves increases in the levels of soluble phenols were observed only in *S. guianensis*. The concentration of chlorophyll *a* and total chlorophyll significantly decreased at 200 mM of NaCl in both cultivars with regards to the control. The levels of chlorophyll *b* decreased in *C. molle* at 200 mM and remained constant in *S. guianensis*. The chlorophyll stability value showed highly significant differences in *C. molle* (-8,154 and 269,1 for 100 and 200mM of NaCl), unlike *S. guianensis* which showed higher stability (20,47 and 31,37). The chlorophyll *a/b* ratio decreased in *Centrosema* and no differences were observed among treatments in *Stylosanthes*.

Key words: *Centrosema molle*, chlorophylls, phenolic compounds, salinity, *Stylosanthes guianensis*

Introducción

La salinidad de los suelos constituye uno de los estreses abióticos más importantes que limitan la productividad de las plantas (Khan y Panda, 2008), como consecuencia de afectaciones en un gran número de aspectos fisiológicos y bioquímicos como la germinación, el crecimiento vegetativo, el vigor, la floración, la fructificación, la fotosíntesis, la pérdida de agua, el desbalance en las concentraciones de iones que conlleva la toxicidad iónica celular y el estrés osmótico (Sairam y Tyagi, 2004; Khan y Panda, 2008). El estrés por salinidad induce la acumulación de especies reactivas del oxígeno (estrés secundario), causando daños a macromoléculas importantes como las proteínas y los ácidos nucleicos (Mittler, 2002); así como a los lípidos de la membrana, lo que ocasiona su deterioro y el aumento de la permeabilidad (Mandhanía *et al.*, 2006; Khan y Panda, 2008).

La capacidad que presentan las plantas para eliminar las especies reactivas del oxígeno constituye un elemento importante para tolerar los estreses ambientales (Ali y Abbas, 2003). El sistema antioxidante de las plantas incluye un grupo de compuestos primarios como carotenoides, flavonoides y compuestos fenólicos; así como enzimas antioxidantes tales como la catalasa, peroxidasas, polifenol oxidasa y ácido indolacético oxidasa (Ali y Abbas, 2003). Los compuestos fenólicos y flavonoides son considerados entre los productos del metabolismo secundario de mayor influencia y amplia distribución en el reino de las plantas, y desempeñan importantes funciones fisiológicas y ecológicas involucradas en la resistencia a diferentes tipos de estrés (Delalande *et al.*, 1996; Ayaz *et al.*, 2000).

La búsqueda de variedades tolerantes al estrés salino constituye una de las prioridades del sector agropecuario para incrementar los rendimientos de importantes cultivos. Los estudios de identificación y caracterización de variedades tolerantes han estado basados en diversos criterios como la productividad, la supervivencia, el vigor, los daños en las hojas, la altura de las plantas y la velocidad relativa de crecimiento, además de los caracteres fisiológicos y bioquímicos (Gama *et al.*, 2007).

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la influencia del cloruro de sodio en indicadores fisiológicos y bioquímicos de dos especies de leguminosas forrajeras: *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 y *Centrosema molle*, durante la fase de crecimiento vegetativo.

Materiales y Métodos

Las semillas de *S. guianensis* cv. CIAT-184 y *C. molle* fueron suministradas por la Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". Estas se lavaron y desinfectaron en solución detergente (1 g/L), seguido de varios enjuagues e inmersión en etanol al 70%; después se introdujeron en hipoclorito de sodio al 5 y al 1% durante 15 y 20 minutos, respectivamente, seguidos en cada caso por tres enjuagues con agua destilada estéril. En el último paso se utilizó agua destilada a 8°C como proceso de escarificación. Las semillas se pusieron a germinar en un suelo vegetal en frascos plásticos de 400 mL. Previo a la siembra de las semillas se determinó la capacidad de campo (CC) del suelo, mediante el método gravimétrico.

Las plantas se mantuvieron en casa de cultivo, con un fotoperíodo de 13 horas luz y a temperatura promedio diaria de 24°C±2, con aplicación de riego al 90% de la CC hasta que desarrollaron las primeras hojas trifoliadas. Posteriormente se realizó un riego con solución de NaCl (0, 50, 100 y 200 mM) al 70% CC durante 15 días.

Se empleó un diseño completamente aleatorizado, con 15 unidades experimentales para cada tratamiento y tres repeticiones.

Determinación de los indicadores morfológicos y bioquímicos. Las raíces, los tallos y las hojas de las plántulas estresadas y no estresadas (control) se pesaron por separado en una balanza digital Sartorius, para la determinación de la materia fresca; mientras que en el caso de la materia seca los órganos similares de las plantas procedentes de las condiciones antes mencionadas, fueron previamente deshidratados en una estufa a 55°C hasta obtener valores constantes. Con estos datos se estimaron, además, otros indicadores como la distribución de la biomasa y la relación raíz-brote.

Determinación de la concentración de fenoles. La extracción de los fenoles solubles se realizó en 10 volúmenes de metanol. Las muestras fueron homogeneizadas y centrifugadas a 27 200 g. El precipitado se resuspendió en NaOH 2M para la extracción de los fenoles ligados a las paredes celulares, y se neutralizó en igual volumen de HCl 2M (Gurr *et al.*, 1992). La concentración de fenoles se determinó utilizando ácido clorogénico (0,05 mol.L⁻¹) como patrón y los valores de absorbancia se determinaron a 760 nm. A partir de los valores de la concentración de fenoles solubles y de los ligados a la pared se calcularon las concentraciones de fenoles totales.

Determinación de la concentración de clorofila. En el caso de los pigmentos fotosintéticos se utilizaron fragmentos de 50 mg del foliolo central de la primera hoja trifoliada, los cuales fueron previamente lavados con agua destilada estéril y secados con papel de filtro. Estos fragmentos se maceraron en 5 mL de solución acuosa de etanol (Sigma) al 96%, en oscuridad. Para determinar el contenido de clorofila *a* y *b*, se emplearon las ecuaciones propuestas por Wintermans y de Mots (1965).

$$Ca \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 13,95 (A_{665}) - 6,68 (A_{649})$$

$$Cb \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 24,96 (A_{649}) - 7,32 (A_{665})$$

$$\text{Clorofila total: } Ca+b \text{ (mg/g)} = (20,2 A_{649}) + (8,02 A_{665})$$

Ca= concentración de clorofila *a*

Cb= concentración de clorofila *b*

El índice de estabilidad clorofílica (IEC, %) se calculó mediante el contenido total de clorofila antes y después de estresadas las plántulas, a partir de la ecuación de Kumari *et al.* (2004).

$$\text{IEC \%} = \frac{[(\text{Contenido de clorofila antes del estrés} - \text{Contenido de clorofila después del estrés}) / \text{Contenido de clorofila después del estrés}] * 100}{}$$

Procesamiento estadístico. Se determinó el ajuste de los datos a una distribución normal mediante la prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza mediante las pruebas de Bartlett (Sigarroa, 1985), y se procesaron mediante ANOVA de clasificación simple o multifactorial según correspondiera. Para comparar las medias se aplicó la prueba de rangos múltiples de Duncan. Los datos se procesaron según el paquete Statgraphic plus 5.1 sobre Windows.

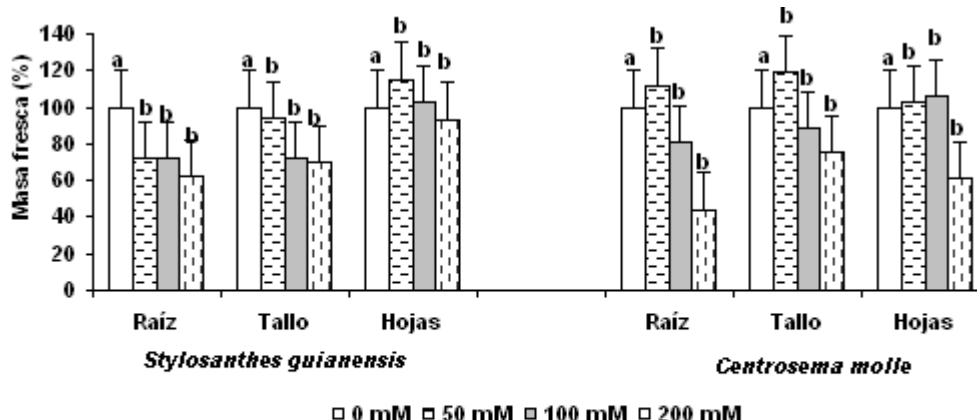
Resultados y Discusión

Peso fresco y peso seco. La adición de concentraciones elevadas de NaCl al sustrato provocó, de manera general, una disminución de materia fresca en la raíz, el tallo y las hojas de ambas especies (fig. 1). Sin embargo, se encontraron diferencias en la respuesta entre los órganos vegetativos y entre las variedades. En *S. guianensis* cv. CIAT-184 las raíces fueron las más sensibles, con una disminución significativa a partir de 50 mM; mientras que en el tallo y las hojas los cambios se observaron a partir de 100 mM y 200 mM, respectivamente.

En *C. molle* los cambios fueron significativos en 200 mM para la raíz, el tallo y la hoja, aunque los porcentajes para cada caso fueron inferiores en comparación con los hallados en *S. guianensis* cv. CIAT-184 a esta concentración.

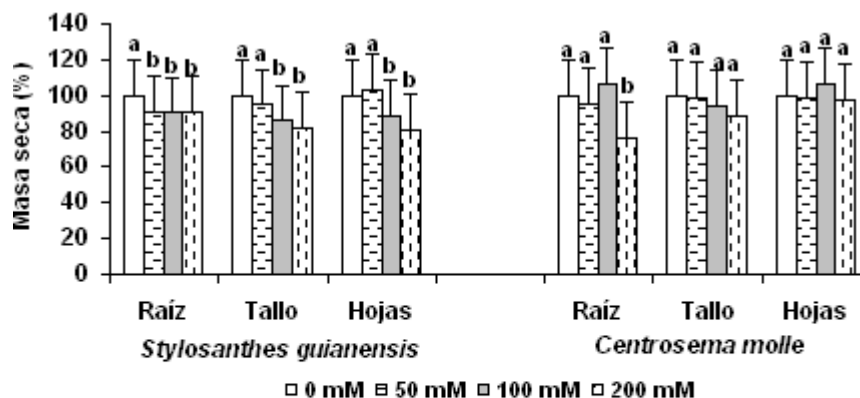
El peso seco (fig. 2) en *S. guianensis* cv. CIAT-184 mostró una disminución a 50 mM para la raíz y el tallo y en las hojas a partir de 100 mM; mientras que en *C. molle* no se encontraron variaciones en el tallo y en la hoja entre los distintos tratamientos y el control; en la raíz el peso seco disminuyó en 200 mM.

El efecto negativo de la salinidad en el peso fresco y seco de los distintos órganos de la planta, ha sido referido por numerosos autores en trabajos con distintas especies vegetales. Los estudios de estrés salino en *Eucalyptus camaldulensis* (Qureshi *et al.*, 2000), *Hordeum vulgare* L. (Ali y Abbas, 2003), *Vicia faba* (Khalafallah *et al.*, 2008), *Zea mays* (Hu *et al.*, 2007) y *Helianthus annuus* L. (Noreen y Ashraf, 2008), mostraron el efecto negativo del NaCl en la materia fresca y seca en las plántulas regadas con diferentes concentraciones de esta sal.



a,b. Letras diferentes indican diferencias estadísticas para un mismo órgano $p < 0,05$ (Duncan, 1955)

Fig. 1. Materia fresca en plantas de *S. guianensis* y *C. molle* con diferentes concentraciones de NaCl
Fig. 1. Fresh matter in *S. guianensis* and *C. molle* plants with different NaCl concentrations.



a,b. Letras diferentes indican diferencias estadísticas para un mismo órgano $p < 0,05$ (Duncan, 1955)

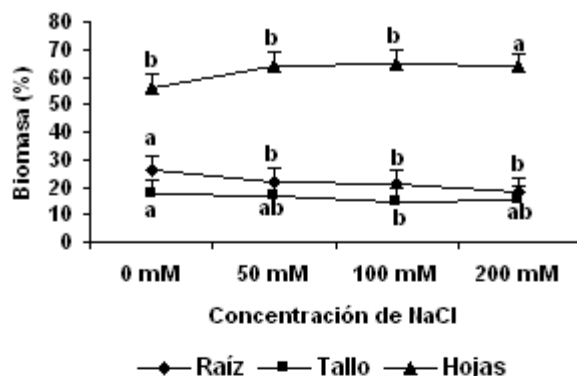
Fig. 2. Materia seca en plantas de *S. guianensis* y *C. molle* con diferentes concentraciones de NaCl.

Fig. 2. Dry matter in *S. guianensis* and *C. molle* plants with different NaCl concentrations.

Los efectos fundamentales del cloruro de sodio sobre tales indicadores pueden estar asociados a una reducción del crecimiento, la división celular por mitosis, la toxicidad iónica (Caseira, 2006; Mohamedin *et al.*, 2006), la reducción en la absorción de agua y la actividad metabólica debido a la toxicidad de los iones Na^+ y Cl^- , así como el déficit de nutrientes provocado por la interferencia iónica (Ghoulam *et al.*, 2002).

Con relación a las diferencias entre los órganos vegetativos, de manera general, las raíces en ambas especies mostraron los valores más bajos en el peso fresco y el peso seco. Esto puede estar asociado a que este órgano se encuentra expuesto directamente al estrés salino, por lo cual el efecto desestabilizador del cloruro de sodio en el ambiente intra y extracelular es mayor en la raíz que en los restantes órganos. Por otra parte, las diferencias entre especies pueden estar determinadas por las características genéticas de cada una en particular y por la presencia de diversos mecanismos de respuesta fisiológica frente al estrés salino (Flowers y Hajibagheri, 2001; Ahmad *et al.*, 2005), como la activación y desactivación de genes que permiten reestablecer la homeostasis iónica y osmótica, para lograr el funcionamiento fisiológico adecuado de las células, los tejidos y los órganos afectados.

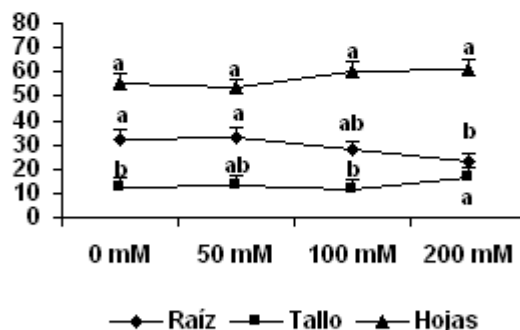
Distribución de la biomasa. Las figuras 3 y 4 muestran la distribución de la biomasa en las plántulas de *Stylosanthes* y *Centrosema*, respectivamente, después de dos semanas de riego con NaCl.



a,b. Letras diferentes indican diferencias estadísticas para un mismo órgano $p < 0,05$ (Duncan, 1955)

Fig. 3. Distribución de la biomasa de *S. guianensis*.

Fig. 3. Biomass distribution of *S. guianensis*.



a,b. Letras diferentes indican diferencias estadísticas para un mismo órgano $p < 0,05$ (Duncan, 1955)

Fig. 4. Distribución de la biomasa de *C. molle* durante el crecimiento en turbas a diferentes concentraciones de NaCl.

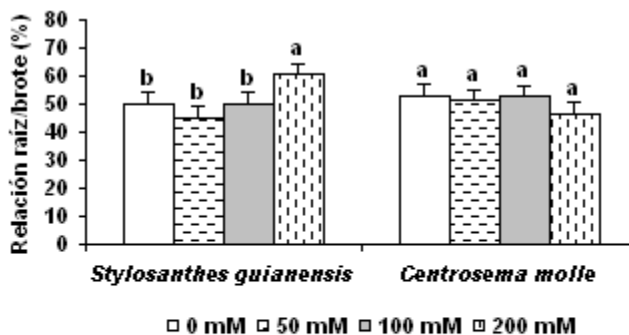
Fig. 4. Biomass distribution of *C. molle* during growth on peats at different NaCl concentrations.

S. guianensis mostró un aumento del porcentaje de masa fresca en las hojas respecto al total, con el aumento de las concentraciones de NaCl en el medio. Inversamente se observó una disminución significativa del porcentaje en las raíces de las variantes con NaCl; mientras que se mantuvo sin cambios significativos para el tallo. De manera similar, el porcentaje de masa fresca disminuyó en las raíces de *C. molle*; sin embargo, no hubo variación entre los tratamientos para las hojas y el porcentaje de masa fresca en el tallo aumentó a 200 mM.

La relación raíz/brote constituye un valor que depende de la distribución de los compuestos fotosintetizados por la planta, y se encuentra bajo la influencia de numerosos factores (Rogers *et al.*, 1996); esta relación depende de la capacidad de la especie o la variedad para modificar la distribución de la masa seca, en función de elevar la tolerancia frente a condiciones estresantes.

Los resultados mostraron un aumento de la relación raíz-brote para *S. guianensis* a 200 mM (fig. 5), lo cual está relacionado con una mayor inhibición del crecimiento del brote bajo estas condiciones. Fisiológicamente puede estar asociado con un incremento en el flujo de los compuestos osmóticamente activos (como las proteínas) hacia las raíces, como un mecanismo para disminuir la diferencia del potencial de agua entre el medio con elevadas concentraciones de sales y los tejidos internos de la raíz, la cual es el órgano en contacto directo con el sustrato y enfrenta el estrés. Resultados similares han

sido descritos por numerosos autores en plantas sometidas a estrés salino y/o hídrico (Okcu *et al.*, 2005; Yagmur y Kaydan, 2008).



a,b. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos para una misma especie a $P < 0,05$ (Duncan, 1955)

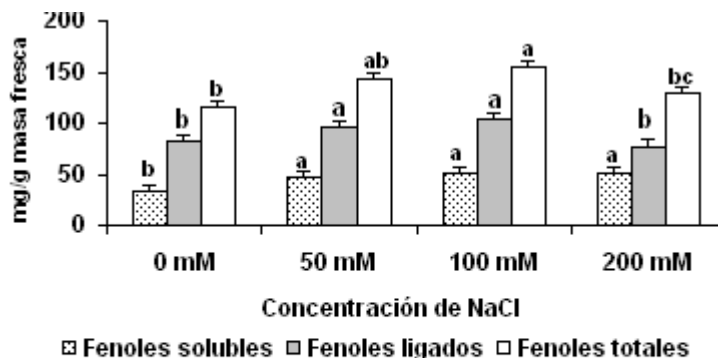
Fig. 5. Relación raíz-brote en plántulas de *S. guianensis* y *C. molle*.

Fig. 5. Root-shoot ratio in *S. guianensis* and *C. molle* seedlings.

En contraste con estos resultados, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos para *C. molle*, lo cual pudiera ser un indicador de la carencia de factores genéticos intrínsecos de la especie, que propicien la síntesis y redistribución de compuestos osmóticamente activos hacia las zonas más afectadas por el estrés salino.

Contenido de fenoles en la raíz y las hojas. La concentración de los compuestos fenólicos es afectada frecuentemente por varios factores internos y externos, como la luz (Kefeli *et al.*, 2003), los nutrientes (Lux-Endrich *et al.*, 2000), el estrés hídrico por defecto y exceso, la radiación y las infecciones patógenas (Kefeli *et al.*, 2003). También puede aumentar o disminuir en dependencia del estadio de la planta (Thomas y Ravindra, 1999).

La exposición de las plántulas de *S. guianensis* al NaCl provocó un aumento en la concentración de fenoles totales en las raíces y el mayor valor se alcanzó a 100 mM (fig. 6). La concentración de fenoles solubles y ligados a la pared aumentaron significativamente después de la aplicación de NaCl. No obstante, a 200 mM se observó una disminución, lo cual puede estar determinado por una ruptura del metabolismo de los fenoles a elevadas concentraciones de esta sal.



a,b,c. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos de una misma variante fenólica a $p < 0,05$ (Duncan, 1955)

Fig. 6. Fenoles totales en las raíces de *S. guianensis*.

Fig. 6. Total phenols in *S. guianensis* roots.

Aunque en las hojas de *S. guianensis* (fig. 7) no se encontraron cambios significativos en las concentraciones de fenoles ligados a la pared y totales, se pudo observar un aumento en la concentración de fenoles solubles a partir de 100 mM con respecto al control. Esto puede estar asociado a la translocación de los compuestos fenólicos desde la raíces hasta las hojas, donde se apreciaron aumentos significativos en la concentración de estos.

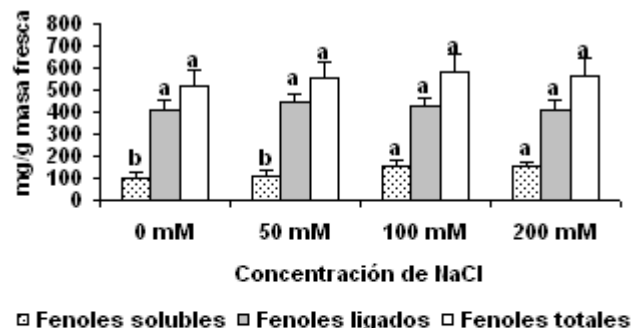


Fig. 7. Fenoles totales en las hojas de *S. guianensis*
 Fig. 7. Total phenols in *S. guianensis* leaves.

Resultados similares fueron reportados por Ali y Abbas (2003) en plántulas de *H. vulgare* L. estresadas con cloruro de sodio 100 mM, en las cuales se encontraron incrementos significativos en las raíces; mientras que en los brotes no se reportaron diferencias entre los tratamientos y el control.

C. molle mostró incrementos significativos en la concentración de fenoles solubles y totales en las raíces (fig. 8); mientras que los fenoles ligados a la pared no mostraron cambios, lo que evidenció la capacidad de *Centrosema* para sintetizar fenoles bajo condiciones estresantes de cloruro de sodio. En las hojas (fig. 9), por el contrario, no se observaron diferencias en la concentración de fenoles solubles entre los distintos tratamientos, y hubo un aumento de los fenoles ligados a la pared que contribuyó a las diferencias entre el control y los distintos tratamientos con relación a la concentración de fenoles totales. El hecho de que no se hayan encontrado incrementos en los valores de fenoles solubles, puede estar asociado a la capacidad de esta especie para trasladar dichos compuestos a las partes aéreas de la planta.

Varios autores han reportado un incremento en los niveles de fenoles posteriormente a la aplicación de sales en el medio (Mazher *et al.*, 2006); ello constituye un mecanismo de defensa antioxidante para la disminución de las concentraciones de especies reactivas del oxígeno, que afectan drásticamente el metabolismo celular y que se generan bajo condiciones de estrés abiótico (Hasegawa *et al.*, 2000; Rahnama y Ebrahimzadeh, 2005).

Contenido de clorofila. La concentración de clorofila puede ser utilizada como un indicador del estado metabólico celular (Yeo y Flowers, 1983). Un decrecimiento del contenido clorofílico se asocia con la toxicidad en los tejidos, debido a la acumulación de iones. La cuantificación del contenido de clorofila (*a*, *b* y total) mostró, para ambos cultivares, una disminución significativa en 200 mM de NaCl para clorofila *a* y total. Sin embargo, la concentración de clorofila *b* no varió en *S. guianensis* entre los tratamientos; mientras que en *C. molle* se observó diferencia entre el control y 200 mM. Por otra parte, se pudo observar al final del experimento una marcada clorosis en las plántulas tratadas con 200 mM de NaCl. Este fenómeno ha sido referido por varios investigadores (Agastian *et al.*, 2000) en las hojas expuestas a largos períodos de estrés salino, lo que conlleva la caída de estas.

Por otra parte, se encontró una mayor estabilidad en el contenido clorofílico de *S. guianensis* a partir de los valores en el IEC (fig. 12); mientras que la relación clorofila *a*/clorofila *b* no varió, y en el caso de *C. molle* disminuyó a 200 mM de NaCl (fig. 13). Šiler *et al.* (2007) plantearon que la variación en el

valor clorofila *a/b* puede estar asociada a cambios entre el contenido del fotosistema I y el fotosistema II bajo condiciones estresantes.

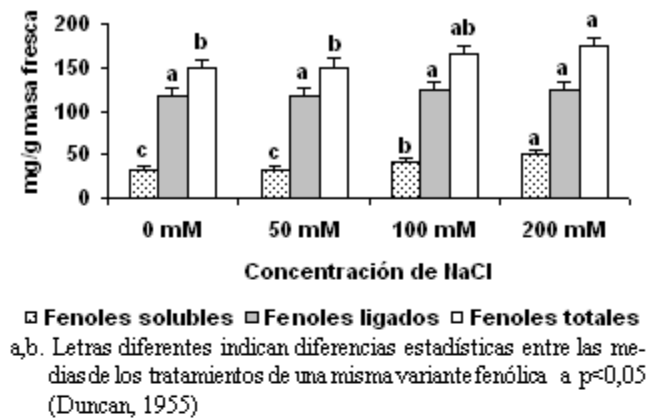


Fig. 8. Fenoles en las raíces de *C. molle*

Fig. 8. Phenols in *C. molle* roots.

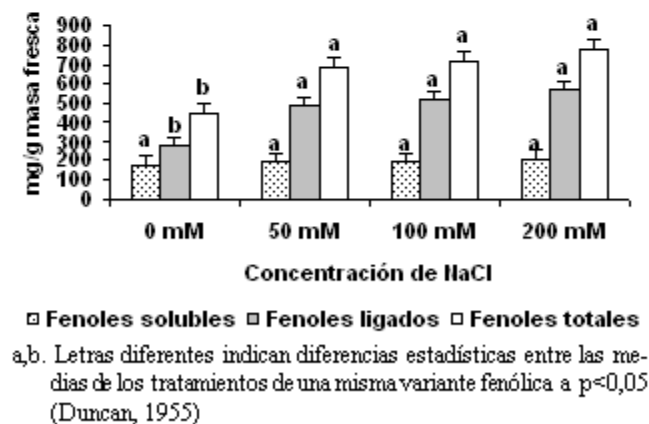


Fig. 9. Fenoles en las hojas de *C. molle*

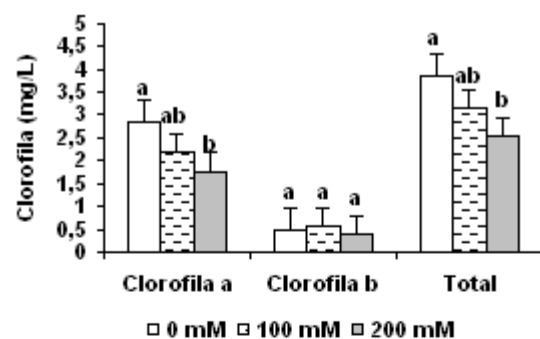
Fig. 9. Phenols in *C. molle* leaves.

En la literatura se reporta un decrecimiento en los niveles de clorofila en diferentes especies de plantas sometidas a estrés salino (Mazher *et al.*, 2006; Khalafallah *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2009). La reducción en el contenido de clorofila en las hojas en condiciones de estrés salino ha sido atribuida a varias causas: la destrucción de los pigmentos clorofilicos e inestabilidad de los complejos proteína-pigmentos (Levit, 1980); la interferencia de los iones salinos con la síntesis de novo de proteínas y componentes estructurales de la clorofila (Jaleel *et al.*, 2007); así como a la concentración de sales en el medio, el tiempo de exposición y la especie (Şiler *et al.*, 2007).

Conclusiones

La aplicación de NaCl a las plántulas de *S. guianensis* y *C. molle* mostró un efecto negativo en el peso fresco y en el peso seco, y la raíz fue el órgano más sensible. La relación raíz-brote se mantuvo sin variación en *Centrosema* y aumentó en *Stylosanthes*, lo que sugiere un mecanismo adaptativo para tolerar el estrés salino. Los fenoles solubles y totales se incrementaron con el aumento de la concentración de NaCl en ambos cultivares y la raíz mostró los mayores incrementos, una respuesta bioquímica común en los vegetales ante variadas situaciones de estrés. La concentración de clorofila *a* disminuyó sensiblemente a 200 mM de NaCl, así como la clorofila total; mientras que la clorofila *b* disminuyó significativamente en *C. molle*. El IEC

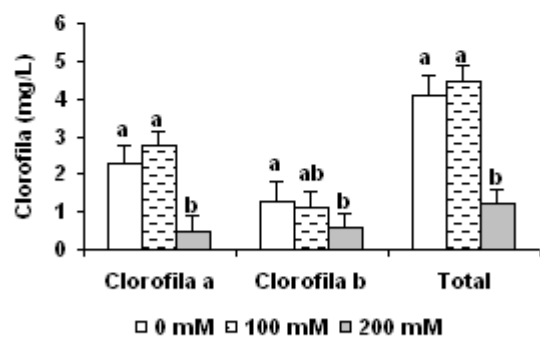
mostró una mayor estabilidad en *S. guianensis*, ya que no varió significativamente la relación clorofila *a/b*; en *C. molle* dicha relación disminuyó.



a,b. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos de una misma variante clorofílica a $p < 0,05$ (Duncan, 1955)

Fig. 10. Concentración de clorofila *a*, *b* y *a+b* en las hojas de *S. guianensis*.

Fig. 10. Concentration of chlorophyll *a*, *b* and *a+b* in *S. guianensis* leaves.



a,b. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos de una misma variante clorofílica a $p < 0,05$ (Duncan, 1955).

Fig. 11. Concentración de clorofila *a*, *b* y *a+b* en las hojas de *C. molle*.

Fig. 11. Concentration of chlorophyll *a*, *b* and *a+b* in *C. molle* leaves.

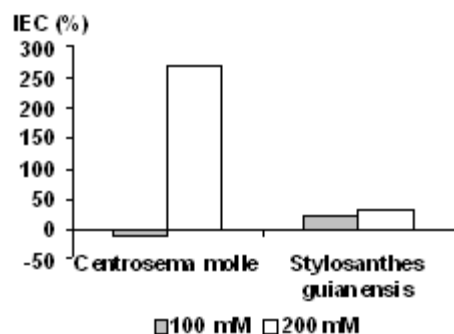
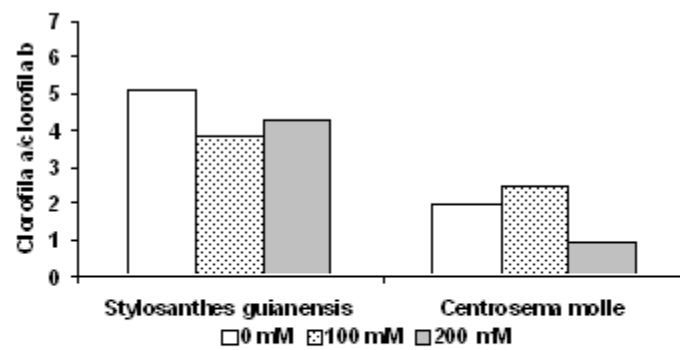


Fig. 12. Índice de estabilidad clorofílica (IEC) en *C. molle* (1) y *S. guianensis* (2).

Fig. 12. Chlorophyll stability value (CSV) in *C. molle* (1) and *S. guianensis* (2).



a,b. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos para una misma especie a $p < 0,05$ (Duncan, 1955)

Fig. 13. Relación clorofila a/clorofila b para *S. guianensis* y *C. molle*.

Fig. 13. Chlorophyll a/chlorophyll b ratio for *S. guianensis* and *C. molle*.

Agradecimiento

Al Dr.C. Orlando Suenin. Facultad de Agronomía (FAGRO), Universidad Central de Venezuela (UCV).

Referencias bibliográficas

- Agastian, P. *et al.* 2000. Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristic in mulberry genotypes. *Photosynthetica*. 38:287
- Ahmad, M. *et al.* 2005. Varietal differences in agronomic performance of six wheat varieties grown under saline field environment. *Int. J. Environ. Sci Tech.* 2 (1):49
- Ali, R.M. & Abbas, H.M. 2003. Response of salt stressed barley seedlings to phenylurea. *Plan Soil Environ.* 49 (4):158
- Ayaz, F.F. *et al.* 2000. Water stress effects on the content of low molecular weight carbohydrates and phenolic acids in *Ctenanthe setsa* (Rosc.) Eichler. *Can. J. Plant Sci.* 80:373
- Caseira, F. 2006. Distribución y producción total de materia seca en guayabo (*Psidium guajava* L. cv Palmira ICA-1) bajo estrés salino. *Orinoquia*. 10(2):56
- Delalonde, M. *et al.* 1996. Development of phenolic compounds in maize anthers (*Zea mays*) during cold pretreatment prior to androgenesis. *J. Plant Physiol.* 149:61
- Flowers, T.J. & Hajibagheri, M.A. 2001. Salinity tolerance in *Hordeum vulgare*: ion concentrations in root cells of cultivars differing in salt tolerance. *Plant and Soil*. 23:1
- Gama, P.B. *et al.* 2007. Physiological response of common bean (*Phaseolus vulg.* L.) seedlings to salinity stress. *African J. of Biotechnology*. 6 (2):79
- Ghoulam, C. *et al.* 2002. Effect of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in fuie sugar beet cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 47:39
- Gurr, S.I. *et al.* 1992. Lignin and associated phenolic acids in cell walls. *Molecular Plant Pathology and Practical Approach*. 3:62
- Hasegawa, P.M. *et al.* 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Mol. Plant Physiol.* 51:463
- Hu, Y.Z. *et al.* 2007. Short-term effects of drought and salinity on mineral nutrient distribution along growing leaves of maize seedlings. *Environmental and Experimental Botany*. 60:268
- Jaleel, C.A. *et al.* 2007. NaCl as physiological modulator of proline metabolism and antioxidant potential in *Phyllanthus amarus*. *C R Biologies*. 330:806
- Kefeli, V.I. *et al.* 2003. Phenolic cycle in plants and environment. *J. Cell Mol. Biol.* 2:13

- Khalafallah, A.A. *et al.* 2008. Tolerance of seven Faba bean varieties to drought and salt stresses. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 4 (2):175
- Khan, M.A. *et al.* 2009. Role of proline, K/Na ratio and chlorophyll content in salt tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pak. J. Bot.* 41 (2):633
- Khan, M.H. & Panda, S.K. 2008. Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiol Plant.* 30:91
- Kumari, M. *et al.* 2004. Physiological parameters governing drought in maize. *Indian J. Plant Physiol.* 9 (2):203
- Levit, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol. II. Academic Press. New York.
- Lux-Endrich, A. *et al.* 2000. Influence of nutrients and carbohydrate supply on the phenol composition of apple shoot cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 60:15
- Mandhania, S. *et al.* 2006. Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings. *Biol. Plant.* 227:227
- Mazher, A.M. *et al.* 2006. Response of *Dalgebia sissoo* to sulphur application under saline condition. *Am. Eur. J. Agric. Environ. Sci.* 1: 215
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7:405
- Mohamedin, A.A.M. *et al.* 2006. Response of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to plants salt stress under different water table depths. *Journal of Applied Sciences Research*. 2 (12):1175
- Noreen, S. & Ashraf, M. 2008. Alleviation of adverse effects of salt stress on sunflower (*Helianthus annuus* L.) by exogenous application of salicylic acid: growth and photosynthesis. *Pak. J. Bot.* 40 (4):1657
- Okcu, G. *et al.* 2005. Effects of salt and drought stresses on germination and seedling growth of pea (*Pisum sativum* L.). *Turk J. Agric For.* 29:237
- Qureshi, T.M. *et al.* 2000. Performance of *Eucalyptus camaldulensis* under different types of salt-affected soils. *Int. J. Agri. Biol.* 2 (1):45
- Rahnama, H. & Ebrahimzadeh, H. 2005. The effect of NaCl on antioxidant enzyme in potato seedlings. *Biol. Plant.* 49 (1):93
- Rogers, H.H. *et al.* 1996. Root to shoot ratio of crops as influenced by CO₂. *Plant Soil.* 187 (82):229
- Sairam, R.K. & Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*. 86:407
- Sigarroa, A. 1985. Biometría y diseño experimental. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. 743 p.
- Šiler, B. *et al.* 2007. Effects of salinity on *in vitro* growth and photosynthesis of common centaury (*Centaurea erythraea* RAFN). *Arch. Biol. Sci. Belgrade.* 59 (2):129
- Thomas, P. & Ravindra, M.B. 1999. Shoot tip culture in mango: Influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments of phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. *J. Horticultural Sci.* 72 (5):713
- Yagmur, M. & Kaydan, D. 2008. Early seedling growth and relative water content of Triticale varieties under osmotic stress of water and NaCl. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 4 (6):767
- Yeo, A.R., & Flowers, T.J. 1983. Varietal differences in the toxicity of sodium ions in rice leaves. *Physiologia Plantarum*. 59:189
- Wintermans, J.F. & de Mots, A. 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochim. Biophys. Acta.* 109:448

Recibido el 11 de noviembre del 2009

Aceptado el 25 de marzo del 2010

Physiological and biochemical response of *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 and *Centrosema molle* to sodium chloride stress

Abstract

A study was conducted on the effect of different concentrations of sodium chloride (NaCl) on seedlings of *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 and *Centrosema molle*, cultivated on topsoil. Fifteen days after the treatment fresh mass, dry mass, root/shoot ratio and biomass distribution were determined, as well as the concentration of soluble phenols, cell wall-bound phenols and total phenols, in addition to chlorophyll *a*, *b* and total chlorophyll. In both cultivars the roots were the most affected organs regarding fresh mass and there was a decrease of dry mass at high concentrations of NaCl. The root/shoot ratio showed an increase at 200 mM of NaCl in *S. guianensis*, while no significant changes were observed in *C. molle*. As the concentration of NaCl increased, the concentration of soluble phenols increased noticeably in the roots of both species, as well as total phenols; while in the leaves increases in the levels of soluble phenols were observed only in *S. guianensis*. The concentration of chlorophyll *a* and total chlorophyll significantly decreased at 200 mM of NaCl in both cultivars with regards to the control. The levels of chlorophyll *b* decreased in *C. molle* at 200 mM and remained constant in *S. guianensis*. The chlorophyll stability value showed highly significant differences in *C. molle* (-8,154 and 269,1 for 100 and 200mM of NaCl), unlike *S. guianensis* which showed higher stability (20,47 and 31,37). The chlorophyll *a/b* ratio decreased in *Centrosema* and no differences were observed among treatments in *Stylosanthes*.

Key words: *Centrosema molle*, chlorophylls, phenolic compounds, salinity, *Stylosanthes guianensis*

Introduction

Soil salinity constitutes one of the most important abiotic stresses which limit plant productivity (Khan and Panda, 2008), as a consequence of affectations in a large number of physiological and biochemical aspects, such as germination, vegetative growth, vigor, flowering, fructification, photosynthesis, water loss, unbalance in ion concentrations brought about by cell ionic toxicity and osmotic stress (Sairam and Tyagi, 2004; Khan and Panda, 2008). Salinity stress induces the accumulation of reactive oxygen species (secondary stress), causing damage to important macromolecules such as proteins and nucleic acids (Mittler, 2002); as well as to the membrane lipids, which causes its deterioration and the increase of permeability (Mandhania *et al.*, 2006; Khan and Panda, 2008).

The capacity of plants to eliminate oxygen reactive species constitutes an important element to tolerate environmental stresses (Ali and Abbas, 2003). The antioxidant system of plants includes a group of primary compounds, such as carotenoids, flavonoids and phenolic compounds; as well as antioxidant enzymes, such as catalase, peroxidases, polyphenol oxidase and indoleacetic acid oxidase (Ali and Abbas, 2003). Phenolic compounds and flavonoids are considered among the secondary metabolism products of higher influence and wide distribution in plant kingdom, and play important physiological and ecological functions involved in resistance to different stress types (Delalonde *et al.*, 1996; Ayaz *et al.*, 2000).

The search for saline stress-tolerant varieties constitutes one of the priorities of the livestock production sector for increasing the yields of important cultivars. The studies of identification and characterization of tolerant varieties have been based on diverse criteria such as productivity, survival, vigor, leaf damage, plant height and relative growth rate, in addition to the physiological and biochemical characteristics Gama *et al.*, 2007).

The objective of this work was to determine the influence of sodium chloride on physiological and biochemical indicators of two forage legume species: *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 and *Centrosema molle*, during the vegetative growth stage.

Materials and Methods

The seeds of *S. guianensis* cv. CIAT-184 and *C. molle* were supplied by the Experimental Station of Pastures and Forages "Indio Hatuey". They were washed and disinfected in detergent solution (1 g/L), followed by rinsing several times and immersion in ethanol at 70%; afterwards, they were introduced in sodium hypochlorite at 5 and 1% during 15 and 20 minutes, respectively, followed in each case by rinsing three times with sterile distilled water. In the last step distilled water at 8°C was used as scarification process. The seeds were put to germinate on topsoil in plastic flasks of 40 mL. Before planting the seeds, the field capacity (FC) was determined through the gravimetric method.

The plants were maintained in cultivation house, with a photoperiod of 13 light hours and at average daily temperature of $24^{\circ}\text{C} \pm 2$, with application of irrigation at 90% of the FC until the first trifoliate leaves were developed. Afterwards, one irrigation was applied with NaCl solution (0, 50, 100 and 200 mM) at 70% FC during 15 days.

A completely randomized design was used with 15 experimental units for each treatment and three repetitions.

Determination of morphological and biochemical indicators. The roots, stems and leaves of the stressed and non-stressed (control) plants were weighed separately on a Sartorius digital scale, for determining fresh matter; while in the case of dry matter the similar organs of the plants from the above-mentioned conditions, were previously dehydrated in an oven at 55°C until obtaining constant values. With these data, other indicators were also estimated such as biomass distribution and root/shoot ratio.

Determination of phenol concentration. The extraction of soluble phenols was made in 10 volumes of methanol. The samples were homogenized and centrifuged at 27 200 g. The precipitate was re-suspended in NaOH 2M for the extraction of cell wall-bound phenols, and it was neutralized in equal volume of HCL 2M (Gurr *et al.*, 1992). Phenol concentration was determined using chlorogenic acid ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$) as pattern, and the absorbance values were determined at 760 nm. From the values of soluble phenol and cell wall-bound phenol concentrations, the total phenol concentrations were calculated.

Determination of chlorophyll concentration. In the case of photosynthetic pigments 50 mg-fragments of the central foliole of the first trifoliate leaf, which were previously washed with sterile distilled water and dried with filter paper, were used. These fragments were macerated in 5 mL of aqueous ethanol solution (Sigma) at 96%, in the dark. In order to determine the chlorophyll *a* and *b* content, the equations proposed by Wintermans and de Mots (1965) were used.

$$Ca \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 13,95 (A_{665}) - 6,68 (A_{649})$$

$$Cb \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 24,96 (A_{649}) - 7,32 (A_{665})$$

$$\text{Total chlorophyll (mg)} = (20A_{649}) + (80A_{665})$$

Ca = Chlorophyll *a* concentration

Cb= Chlorophyll *b* concentration

The chlorophyll stability value (CSV, %) was calculated by means of the total chlorophyll content before and after the seedlings were stressed, from the equation proposed by Kumari *et al.* (2004).

$\text{CSV \%} = [(\text{Chlorophyll content before stress} - \text{Chlorophyll content after stress}) / \text{Chlorophyll content after stress}] * 100$.

Statistical processing. The data adjustment to a normal distribution was determined through the Kolmogorov-Smirnov adjustment goodness test and variance homogeneity through Bartlett's tests (Sigarroat, 1985), and were processed by simple or multifactorial classification according to the need. In order to compare the means, Duncan's multiple range comparison test was applied. The data were processed according to the pack Statgraphic plus 5.1 on Windows.

Results and Discussion

Fresh weight and dry weight. The addition of high NaCl concentrations to the substratum caused, in general, a decrease of fresh matter in the root, stem and leaves of both species (fig. 1). However, differences were found in the response among vegetative organs and between the varieties. In *S. guianensis* cv. CIAT-184 the roots were the most sensitive organs, with a significant decrease from 50 mM; while in the stems and leaves the changes were observed from 100 mM and 200 mM, respectively. In *C. molle* the changes were significant at 200 mM for the root, stem and leaf, although the percentages for each case were lower as compared to the ones found in *S. guianensis* cv. CIAT.184 at this concentration.

The dry weight (fig. 2) in *S. guianensis* cv. CIAT-184 showed a decrease at 50 mM for the root and stem in the leaves from 100 mM; while in *C. molle* no variations were found in the stem and leaf among the different treatments and the control; in the root the dry weight decreased at 200 mM.

The negative effect of salinity on the fresh and dry weight of different plant organs has been referred by many authors in works with different plant species. The studies of saline stress in *Eucalyptus camaldulensis* (Qureshi *et al.*, 2000), *Hordeum vulgare* L. (Ali and Abbas, 2003), *Vicia faba* (Khalafallah *et al.*, 2008), *Zea mays* (Hu *et al.*, 2007) and *Helianthus annuus* L. (Noreen and Ashraf, 2008), showed the negative effect of NaCl on fresh and dry matter in the seedlings irrigated with different concentrations of this salt.

The main effects of sodium chloride on such indicators can be associated to a growth reduction, the cellular division by mitosis, ionic toxicity (Caseira, 2006; Mohamedin *et al.*, 2006), the reduction in water absorption and the metabolic activity due to the toxicity of Na⁺ and Cl⁻, as well as the deficit of nutrients caused by ionic interference (Ghoulam *et al.*, 2002).

Regarding the differences among vegetative organs, in general, the roots in both species showed the lowest values in fresh and dry weight. This can be associated to the fact that this organ is directly exposed to saline stress, for which the destabilizing effect of sodium chloride on the intra- and extracellular environment is higher in the root than in the other organs. On the other hand, the differences between species can be determined by the genetic characteristics of each one in particular and by the presence of diverse mechanisms of physiological response to saline stress (Flowers and Hajibagheri, 2001; Ahmad *et al.*, 2005), such as the activation and deactivation of genes which allow to reestablish the ionic and osmotic homeostasis, in order to achieve the adequate physiological functioning of the affected cells, tissues and organs.

Biomass distribution. Figures 3 and 4 show the biomass distribution in the *Stylosanthes* and *Centrosema* seedlings, respectively, after two weeks of irrigation with NaCl.

S. guianensis showed an increase of the fresh mass percentage in the leaves as compared to the total, with the increase of NaCl concentrations in the environment. Inversely, a significant decrease was observed of the percentage in the roots of the variants with NaCl; while it remained without significant changes for the stem. Similarly, the fresh mass percentage decreased in the roots of *C. molle*; nevertheless, there was no variation among the treatments for the leaves and the fresh mass percentage increased at 200 mM.

The root/shoot ratio constitutes a value that depends on the distribution of the compounds photosynthesized by the plant, and it is under the influence of many factors (Rogers *et al.*, 1996); this ratio depends on the capacity of the species or variety to modify the fresh mass distribution, in order to increase tolerance to stressing conditions.

The results showed an increase of the root/shoot ratio for *S. guianensis* at 200 mM (fig. 5), which is related to higher inhibition of shoot growth under these conditions. It can be physiologically associated to an increase in the flow of osmotically active compounds (such as proteins) toward roots, as a mechanism to decrease the difference of the water potential between the environment with high salt concentrations and the internal tissues of the root, which is the organ in direct contact with the

substratum, facing the stress. Similar results have been described by many authors in plants subject to saline and/or water stress (Okcu *et al.*, 2005; Yagmur and Kaydan, 2008).

In contrast with these results, no significant differences were found among the different treatments for *C. mole*, which could be an indicator of the lack of intrinsic genetic factors of the species propitiating synthesis and redistribution of osmotically active compounds towards the most affected zones by saline stress.

Phenol content in the root and leaves. The concentration of phenolic compounds is frequently affected by several internal and external factors, such as light (Kefeli *et al.*, 2003), nutrients (Lux-Endrich *et al.*, 2000), water stress by defect and excess, radiation and pathogenic infections (Kefeli *et al.*, 2003). It can also increase or decrease depending on the plant stage (Thomas and Ravindra, 1999).

The exposure of *S. guianensis* seedlings to NaCl caused an increase in the concentration of total phenols in the roots and the highest value was obtained at 100 mM (fig. 6). The concentration of soluble and cell wall-bound phenols significantly increased after the application of NaCl. However, at 200 mM a decrease was observed, which can be determined by a rupture of phenol metabolism at high concentrations of this salt.

Although in the leaves of *S. guianensis* (fig. 7) no significant changes were found in the concentrations of cell wall-bound phenols and total phenols, an increase in the concentration of soluble phenols could be observed from 100 mM as compared to the control. This can be associated to the translocation of phenolic compounds from the roots to the leaves, where significant increases were observed in their concentrations.

Similar results were reported by Ali and Abbas (2003) in *H. vulgare* L. seedlings stressed with sodium chloride 100 mM, in which significant increases were found in the roots; while in the shoots no differences were reported between the treatments and the control.

C. molle showed significant increases in the concentration of soluble and total phenols in the roots (fig. 8), while cell wall-bound phenols did not show changes, which proved the capacity of *Centrosema* to synthesize phenols under stressing conditions of sodium chloride. In the leaves (fig. 9), on the contrary, no differences were observed in the concentration of soluble phenols among the different treatments, and there was an increase of cell wall-bound phenols which contributed to the differences between the control and the different treatments with regards to total phenol concentration. The fact that no increases were found in the values of soluble phenols, can be associated to the capacity of this species to transport such compounds to the aerial parts of the plant.

Several authors have reported an increase in the phenol levels after the application of salts in the environment (Mazher *et al.*, 2006); it constitutes an antioxidant defense mechanism for the decrease of the reactive oxygen species concentrations, which affect drastically cell metabolism and are generated under abiotic stress conditions (Hasegawa *et al.*, 2000; Rahnama and Ebrahimzadeh, 2005).

Chlorophyll content. The chlorophyll concentration can be used as an indicator of the cell metabolic status (Yeo and Flowers, 1983). A decrease of the chlorophyll content is associated to tissue toxicity, due to the accumulation of ions. The quantification of the chlorophyll content (*a*, *b* and total) showed, for both cultivars, a significant decrease at 200 mM of NaCl for chlorophyll *a* and total chlorophyll. However, the concentration of chlorophyll *b* did not vary in *S. guianensis* among treatments, while in *C. molle* difference was observed between the control and 200 mM. On the other hand, marked chlorosis could be observed at the end of the trial in the seedlings treated with 200 mM of NaCl. This phenomenon has been referred by several researchers (Agastian *et al.*, 2000) in the leaves exposed to long periods of saline stress, which leads to their fall.

On the other hand, higher stability was found in the chlorophyll content of *S. guianensis* from the values in the CSV (fig. 12); while the chlorophyll *a*/chlorophyll *b* ratio did not vary, and in the case of *C. molle* it decreased at 200 mM of NaCl. Šiler *et al.*, (2007) stated that the variation in the chlorophyll *a/b* value can be associated to changes between the content of photosystem I and photosystem II under stressing conditions.

In literature a decrease is reported in the chlorophyll values of different plant species subject to saline stress (Mazher *et al.*, 2006; Khalafallah *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2009). The reduction in the chlorophyll

content of leaves under saline stress conditions has been ascribed to several causes: the destruction of chlorophyll pigments and instability of the protein pigment complexes (Levit, 1980); the interference of saline ions with the novo synthesis of proteins and structural components of chlorophyll (Jaleel *et al.*, 2007); as well as the salt concentration in the environment, exposure time and species (Šiler *et al.*, 2007).

Conclusions

The application of NaCl to *S. guianensis* and *C. molle* seedlings showed a negative effect on the fresh and dry weight, and the root was the most sensitive organ. The root/shoot ratio remained without variation in *Centrosema* and increased in *Stylosanthes*, which suggests an adaptation mechanism to tolerate saline stress. Soluble and total phenols increased with the increase of the NaCl concentration in both cultivars and the root showed the highest increases, a common biochemical response in plants to varied stress situations. The chlorophyll *a* concentration decreased remarkably at 200 mM of NaCl, as well as total chlorophyll; while chlorophyll *b* decreased noticeably in *C. molle*. The CSV showed higher stability in *S. guianensis*, because the chlorophyll *a/b* ratio did not vary significantly; in *C. molle* such ratio decreased.

Acknowledgements

To Dr. Orlando Suenin. Facultad of Agronomy (FAGRO), Central University of Venezuela (UCV).