

Influencia del NaCl en indicadores bioquímicos evaluados en callos de *Stylosanthes guianensis* CIAT-184

Influences of the NaCl in biochemical indicators evaluated in callus of *Stylosanthes guianensis* CIAT-184

Leticia Fuentes¹, Y. Pérez¹, Amalia Domínguez¹, A.R. Mesa² y S. González³

¹ Centro de Estudios Biotecnológicos-Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". CP 44740

E-mail: leticia.fuentes@umcc.cu

² EEPF "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba

³ Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

Resumen

La acumulación de determinados metabolitos y los cambios en la actividad de enzimas antioxidantes, como la catalasa y la peroxidasa, pueden relacionarse con las potencialidades de una planta para contrarrestar el efecto nocivo de la salinidad en los diferentes procesos fisiológicos y morfológicos. En el presente trabajo se determinaron los contenidos de proteínas y carbohidratos totales, así como la actividad de enzimas catalasas y peroxidasas, en callos obtenidos a partir de tres explantes de *Stylosanthes guianensis* CIAT-184, cultivados en medio MS suplementado con 1 mg/L de 2,4-D, 2 mg/L de 6 BAP y diferentes concentraciones de NaCl (0, 25, 50, 75 y 100 mM). La actividad catalasa fue mayor en las hojas verdaderas que en el resto de los explantes, aunque en los tres casos aumentó hasta 50 mM de NaCl para luego decrecer progresivamente. Por su parte, los hipocótilos mostraron la mayor actividad peroxidasa, con incrementos sostenidos hasta los 100 mM de la sal; mientras que en los otros explantes la actividad decreció a partir de 75 mM. No se detectaron cambios sustanciales en la concentración de proteínas totales; mientras que en los carbohidratos hubo un incremento considerable para las mayores concentraciones de cloruro de sodio, lo cual pudiera tener relación con la acumulación de osmolitos protectores.

Palabras clave: Callo, carbohidratos, enzima, salinidad, *Stylosanthes guianensis*

Abstract

The accumulation of certain metabolites and the changes in the activity of antioxidant enzymes, such as catalases and peroxidases, can be related to the plant possibilities for counteracting the negative effects of salinity on physiological and morphological processes. In this work, the levels of total proteins and carbohydrates, and the enzymatic activities of catalases and peroxidases were determined in calluses obtained from three explants of *Stylosanthes guianensis* CIAT-184, cultured in MS medium supplied with 1 mg/L of 2,4-D, 2 mg/L of 6 BAP and different concentrations of NaCl (0, 25, 50, 75 and 100 mM). Although the activity of catalases increased until 50 mM in the three explants and diminished after that, the highest values were detected in true leaves. On the other hand, the hypocotyls showed the highest activity of peroxidases with progressive increments until 100 mM of the evaluated salt, while the rest of explants showed a decrease in the enzymatic activities from 75 mM. No appreciable changes were detected in total proteins, while in the carbohydrates there was considerable increase for the highest values of sodium chloride, which could be related to the accumulation of protecting osmolytes.

Key words: Callus, carbohydrates, enzyme, salinity, *Stylosanthes guianensis*

Introducción

La respuesta fisiológica de las plantas al estrés salino es multigénica, ya que se afectan varios procesos vinculados a los mecanismos de tolerancia, tales como la producción de compuestos osmóticamente activos, la producción de especies reactivas al oxígeno, los mecanismos de defensa antioxidante, el transporte iónico y la compartimentación de iones perjudiciales en las vacuolas (Sairam y Tyagi, 2004).

La tolerancia de diferentes especies a estreses ambientales se correlaciona con un eficiente sistema antioxidante, que comprende un grupo de enzimas detoxificadoras, como las superóxido dismutasas, las catalasas y peroxidases (Gueta-Dahan, Yaniv, Zilinskas y Ben-Hayyin, 1997; Sreenivasulu, Grimm, Wobus y Weschke, 2000), y antioxidantes no enzimáticos como polisacáridos, poliaminas y aminoácidos, entre otros.

El origen común de las especies vegetales a partir de ancestrales que habitaron el medio marino, sugiere la posibilidad de obtener plantas más tolerantes a la salinidad mediante el cultivo reiterado en estas condiciones, dada la posibilidad de existencia de genes de tolerancia en todas las plantas (Zhu, 2001). Los trabajos de mejora genética por los métodos convencionales, poco aplicables al género *Stylosanthes* (el cual agrupa la tercera parte de las leguminosas destinadas a la ganadería), conllevan la utilización combinada de métodos biotecnológicos y selectivos (Consoli, Vieira, Lopes de Souza y García, 1996; Quecini, Oliveira, Alves y Vieira, 2002). Este género es reconocido como un modelo de regeneración *in vitro*, con diferencias en la respuesta a las condiciones de cultivo a nivel de especies, entre cultivares e incluso entre explantes de un mismo cultivar.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad enzimática de catalasas y peroxidases, así como los contenidos de proteínas y carbohidratos totales de diferentes explantes de *Stylosanthes guianensis* CIAT-184, sometidos a medios inductores de callos organogénicos en condiciones de estrés salino.

Introduction

The physiological response of plants to the saline stress is multigenic, because several processes linked to the tolerance mechanisms are affected, such as the production of osmotically active compounds, production of species reactive to oxygen, mechanisms of antioxidant defense, ionic transport and compartmentalization of damaging ions in the vacuoles (Sairam and Tyagi, 2004).

The tolerance of different species to environmental stresses is correlated to an efficient antioxidant system, which comprises a group of detoxifying enzymes, such as superoxide dismutases, catalases and peroxidases (Gueta-Dahan, Yaniv, Zilinskas and Ben-Hayyin, 1997; Sreenivasulu, Grimm, Wobus and Weschke, 2000), and non enzymatic antioxidants such as polysaccharides, polyamines and aminoacids, among others.

The common origin of plant species from ancestors that inhabited the sea, suggests the possibility of obtaining more salinity-tolerant plants by means of the repeated cultivation under these conditions, given the possibility of existence of tolerance genes in all plants (Zhu, 2001). The works of genetic improvement by conventional methods, little applicable to the *Stylosanthes* genus (which encloses a third of the legumes dedicated to livestock production), lead to the combined utilization of biotechnological and selective methods (Consoli, Vieira, Lopes de Souza and García, 1996; Quecini, Oliveira, Alves and Vieira, 2002). This genus is renowned as an *in vitro* regeneration model, with differences in the response to the cultivation conditions at species level, among cultivars and even among explants of the same cultivar.

The objective of this work was to evaluate the enzymatic activity of catalases and peroxidases, as well as the protein and total carbohydrate contents of different explants of *Stylosanthes guianensis* CIAT-184, subject to inducing media of organogenic calluses under saline stress conditions.

Materiales y Métodos

Para la inducción de la organogénesis, las plántulas de un mes de germinadas en sustrato inerte humedecido con agua destilada estéril, se seccionaron en fragmentos de 10 mm de sus hipocótilos (Hi), hojas cotiledonales (Hc) y hojas verdaderas (Hv). Estos se colocaron en frascos de cristal con 30 mL de medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 7 g/L de agar, 15 g/L de sacarosa, 2,4-D (1,0 mg/L), 6 BAP (2 mg/L), vitaminas MS y varias concentraciones de NaCl (0 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM y 100 mM).

Se utilizaron seis frascos con seis explantes (dos de cada tipo) para cada una de las cinco variantes de medios de cultivo, en un diseño completamente aleatorizado, con tres réplicas de cada tratamiento.

A los 21 días de sembrados los explantes se realizó la determinación de las actividades enzimáticas catalasa y peroxidasa en los callos, los cuales se lavaron con agua destilada estéril para eliminar los restos de agar y se secaron sobre papel de filtro estéril. Después se homogenizaron en frío, en un mortero de porcelana con una solución tampón de fosfato de sodio (50 mM, pH 7,0) y luego se centrifugaron a 10 000 rpm. Inmediatamente se extrajo el sobrenadante para la medición de la actividad enzimática.

La actividad catalasa se determinó a través de la velocidad de descomposición del H_2O_2 a 240 nm en una solución tampón de fosfato de potasio (20 mM, pH 7,0), que contenía 3% (v/v) de H_2O_2 ; el volumen final del ensayo fue de 3 mL. La actividad peroxidasa se midió por el método guaiacol peroxidasa a 25°C (Chance y Machley, 1955). La actividad enzimática se realizó en un volumen final de 3 mL, que contenía: 2,80 mL de solución tampón de fosfato de sodio (0,1 M, pH 7,0); 0,05 mL de solución guaiacol (0,018 M) y 0,05 mL de solución de H_2O_2 previamente ajustada a una absorbancia entre 0,40-0,41; se utilizó como blanco agua destilada. La lectura se hizo a 436 nm en un espectrofotómetro (Ultrospect 2000); se tomaron tres réplicas por cada tratamiento.

Materials and Methods

For the induction of the organogenesis, the one-month old seedlings germinated in inert substratum moisturized with sterile distilled water were divided into 10 mm fragments of their hypocotyls (Hy), cotyledonal leaves (Cl) and true leaves (Tl). They were placed in glass flasks with 30 mL of MS medium (Murashige and Skoog, 1962), supplemented with 7 g/L of agar, 15 g/L of sucrose, 2,4-D (1,0 mg/L), 6 BAP (2 mg/L), MS vitamins and several concentrations of NaCl (0 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM and 100 mM).

Six flasks with six explants (two of each type) were used for each of the five variants of cultivation media, in a completely randomized design, with three replications of each treatment.

Twenty-one days after the explants were sown, the enzymatic activities catalase and peroxidase were determined in the calluses, which were washed with sterile distilled water to eliminate the remnants of agar and they were dried on sterile filter paper. Afterwards they were cold-homogenized, in a porcelain mortar with a buffer solution of sodium phosphate (50 mM, pH 7,0) and then centrifugated at 10 000 rpm. The supernatant was immediately extracted for measuring the enzymatic activity.

The catalase activity was determined through the decomposition rate of H_2O_2 at 240 nm in a buffer solution of potassium phosphate (20 mM, pH 7,0), which contained 3% (v/v) of H_2O_2 ; the final volume of the essay was 3 mL. The peroxidase activity was measured by the guaiacol peroxidase method at 25 °C (Chance and Machley, 1955). The enzymatic activity was determined in a final volume of 3 mL, which contained: 2,80 mL of buffer solution of sodium phosphate (0,1 M, pH 7,0); 0,05 mL of guaiacol solution (0,018 M) and 0,05 mL of H_2O_2 solution previously adjusted to an absorbance between 0,40 and 0,41; distilled water was used as blanc. The reading was made at 436 nm in a spectrophotometer (Ultrospect 2000); three replications were taken per treatment.

The protein concentration was estimated through Lowry's method (Lowry, Rosebrough,

La concentración de proteínas se estimó por el método de Lowry (Lowry, Rosebrough, Farr y Randall, 1951) a partir del sobrenadante tomado de las muestras homogenizadas.

Los carbohidratos totales se determinaron en el sobrenadante de las muestras homogenizadas por el método del fenol-sulfúrico, utilizando glucosa como solución estándar (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers y Smith, 1956).

En todos los casos se tomaron muestras de diez callos y tres lecturas de densidad óptica (DO). Los datos se procesaron según el paquete Statgraphic Plus 4 sobre Windows y se determinó el ajuste a una distribución normal mediante la prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza mediante las pruebas de Bartlett (Sigarroat, 1985). En los casos en que los datos cumplieron los requisitos exigidos se procesaron mediante ANOVA de clasificación simple o multifactorial, y por la prueba de rangos múltiples de Duncan, según correspondiera. Los datos que no cumplieron con estas premisas se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Kruskal y Wallis, 1952) y la prueba de rangos múltiples de Student-Newman-Keuls (SNK).

Resultados y Discusión

A la semana de sembrados los tres explantes (Hi, Hc y Hv) en medio MS, suplementado con diferentes concentraciones de NaCl, se apreció la formación de masas de tejido desdiferenciado de color blanquecino en los sitios donde se realizó el corte. A los 15 días de la siembra eran evidentes masas callogénicas de aspecto friable (Pierik, 1990) en la superficie vegetal de todos los explantes (fig. 1), que manifestaban diferencias en cuanto al tamaño, la coloración y la textura. En la variante de medio suplementada con 100 mM de cloruro de sodio los callos tenían un menor desarrollo, con una coloración parda más intensa y una textura mucho más friable que en las restantes variantes de cultivo.

A los 30 días la mayoría de los explantes estaban completamente transformados en callos, aunque en algunos casos los hipocótilos en 75 mM mantenían zonas poco desdiferenciadas. Sin em-

Farr and Randall, 1951) from the supernatant taken from the homogenized samples.

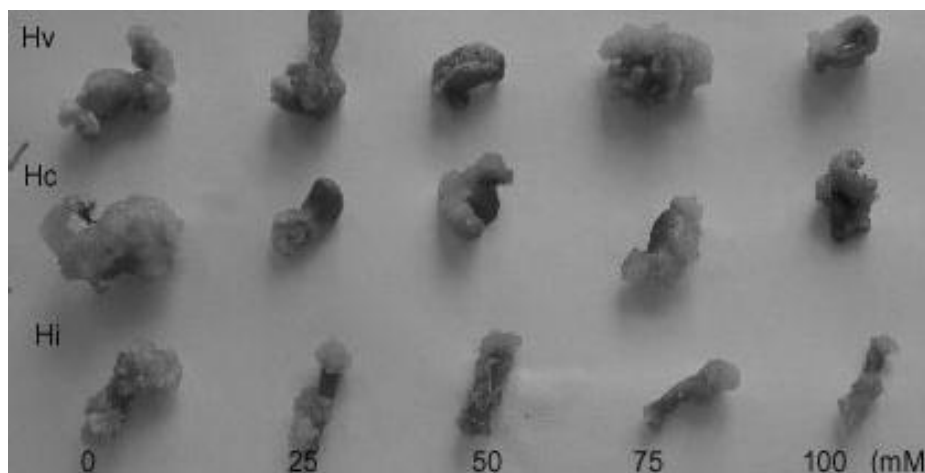
The total carbohydrates were determined in the supernatant of the homogenized samples by means of the phenol-sulphuric method, using glucose as standard solution (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers and Smith, 1956).

In all the cases samples from ten calluses and three readings of optical density (OD) were taken. The data were processed according to the pack Statgraphic Plus 4 on Windows and the adjustment to a normal distribution was determined by the Kolmogorov-Smirnov adjustment goodness test and the variance homogeneity through Bartlett's tests (Sigarroat, 1985). In the cases in which the data fulfilled the requisites demanded, they were processed by means of simple or multifactorial classification ANOVA, and by Duncan's multiple range test, as needed. The data that did not fulfill these premises were compared through Kruskal-Wallis' test (Kruskal and Wallis, 1952) and the multiple range test of Student-Newman-Keuls (SNK).

Results and Discussion

A week after being sown the three explants (Hy, Cl and Tl) in MS medium, supplemented with different concentrations of NaCl, the formation of whitish undifferentiated tissue masses was observed in the sites where the cutting was performed. Fifteen days after sowing callogenic masses of friable aspect (Pierik, 1990) were evident in the surface of all the explants (fig. 1), which showed differences regarding the size, color and texture. In the variant of medium supplemented with 100 mM of sodium chloride the calluses were less developed, with a more intense brown color and a more friable texture than in the other cultivation variants.

Thirty days after being sown most of the explants were completely transformed into calluses, although in some cases the hypocotyls in 75 mM maintained little undifferentiated zones. However, the formation of complete seedlings in Hy cultivated at 100 mM was interesting, which indicates direct organogenesis.



Hi: hipocótilos, Hc: hojas cotiledonales, Hv: hojas verdaderas

Fig. 1. Formación de callos en explantes de *S. guianensis* CIAT-184 a los 15 días de la siembra.

Fig. 1. Formation of calluses in explants of *S. guianensis* CIAT-184 15 days after sowing.

bargo, resultó interesante la formación de plántulas completas en Hi cultivados a 100 mM, lo que indica una organogénesis directa. En presencia de hormonas la respuesta morfológica, en términos de desarrollo de callos y formación de brotes o raíces, depende de la parte de la planta a partir de la que se obtuvo el callo (Consoli et al., 1996).

La capacidad callogénica *in vitro* de diferentes especies de este género ha sido referida por varios autores (Meijer, 1982; Consoli et al., 1996; Valarini, Otsuk y Vieira, 1997; Fuentes, Mesa, Ruíz, Peláez de Lucas y Fernández, 2005), siempre que se utilice un medio de cultivo suplementado con auxinas y citoquininas en una relación menor que uno (Mroginski y Kartha, 1981). Sin embargo, no se han encontrado referencias en relación con la formación de callos en presencia de cloruro de sodio.

La formación de callos a partir de distintos fragmentos de plantas en condiciones salinas, ha sido reportada por varios autores en otras especies tales como: *Cicer arietinum* (Pandey y Ganapathy, 1985); *Lycopersicon esculentum* Mill Peto 863 (El-Enany, 1995); cuatro cultivares de *Solanum tuberosum* (Rahnama, Ebrahimzadeh y Ghareyazie, 2003), en la espe-

In the presence of hormones the morphological response, in terms of callus development and formation of growths or roots, depends on the part of the plant from which the callus was obtained (Consoli et al., 1996).

The *in vitro* callogenic capacity of different species of this genus has been referred by several authors (Meijer, 1982; Consoli et al., 1996; Valarini, Otsuk and Vieira, 1997; Fuentes, Mesa, Ruíz, Peláez de Lucas and Fernández, 2005), as long as a cultivation medium supplemented with auxins and cytokinins is used in a ratio lower than one (Mroginski and Kartha, 1981). Nevertheless, no references have been found regarding the formation of calluses in the presence of sodium chloride.

The formation of calluses from different fragments of plants under saline conditions, has been reported by several authors in other species such as: *Cicer arietinum* (Pandey and Ganapathy, 1985); *Lycopersicon esculentum* Mill Peto 863 (El-Enany, 1995); four cultivars of *Solanum tuberosum* (Rahnama, Ebrahimzadeh and Ghareyazie, 2003), in the species *Alhagi graecorum*, tolerant to concentrations between 43 and 200 mM (Hassanein, 2004) and in *Chrysanthemum morifolium* (Hossain, Azad,

cie *Alhagi graecorum*, tolerante a concentraciones entre 43 y 200 mM (Hassanein, 2004) y en *Chrysanthemum morifolium* (Hossain, Azad, Datta y Biswas, 2007). En los estudios realizados en *C. arietinum* fue posible obtener líneas celulares tolerantes hasta 200 mM, las cuales eran capaces de acumular determinados metabolitos como la prolina, a diferencia de las líneas susceptibles evaluadas como control.

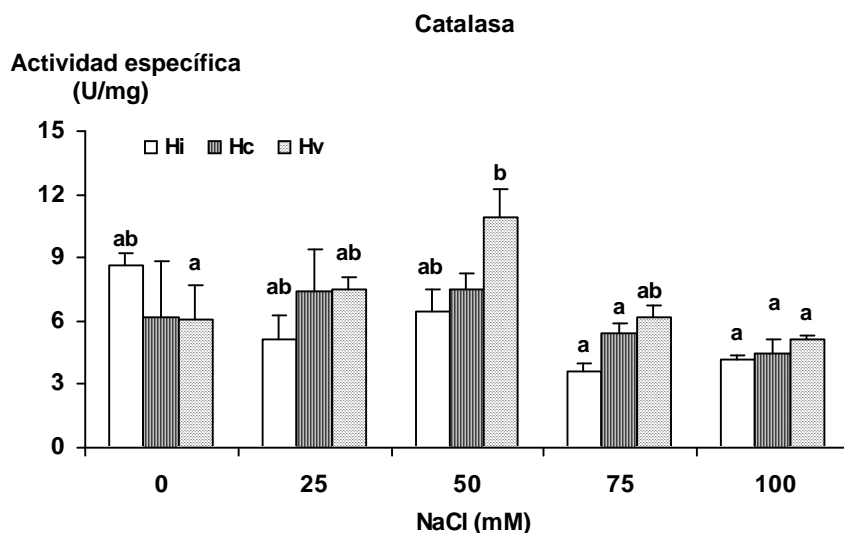
Otras posibles respuestas al estrés producido por NaCl en el medio de cultivo están relacionadas con la activación de mecanismos antioxidantes. En este sentido, en callos de 21 días de formados en condiciones salinas la actividad catalasa se mantuvo, de manera general, sin variaciones significativas hasta 50 mM, con excepción de los callos obtenidos a partir de Hv, donde se observó un incremento notable (fig. 2). Sin embargo, con concentraciones superiores la actividad enzimática decreció considerablemente.

Estos resultados pudieran estar relacionados con la afectación de la expresión de la enzima o de la propia actividad de ella por cambios en la conformación de su estructura, cuando las concentraciones son superiores a 50 mM de sal. En

Datta and Biswas, 2007). In the studies carried out in *C. arietinum* it was possible to obtain cell lines tolerant up to 200 mM, which were capable of accumulating certain metabolites such as proline, unlike the susceptible lines evaluated as control.

Other possible responses to the stress produced by NaCl in the cultivation medium are related to the activation of antioxidant mechanisms. In this sense, in 21-day-old calluses formed under saline conditions, the catalase activity was maintained, in general, without significant variations until 50 mM, with the exception of the calluses obtained from T1, where a remarkable increase (fig. 2) was observed. Yet, with higher concentrations the enzymatic activity decreased considerably.

These results can be related to the affectation of the enzyme expression or its activity due to changes in the conformation of its structure, when the concentrations are higher than 50 mM of salt. In the studies performed by Rahnama *et al.* (2003), in four cultivars of *S. tuberosum* subject to saline stress (between 0 and 150 mM of NaCl) changes were observed in the catalase activity depending on the variety.



a,b Letras diferentes indican diferencias significativas según test de rangos múltiples de SNK ($P < 0,05$)

Fig. 2. Actividad catalasa en callos obtenidos a partir de diferentes explantes de *S. guianensis* cv. CIAT-184.

Fig. 2. Catalase activity in calluses obtained from different explants of *S. guianensis* cv. CIAT-184.

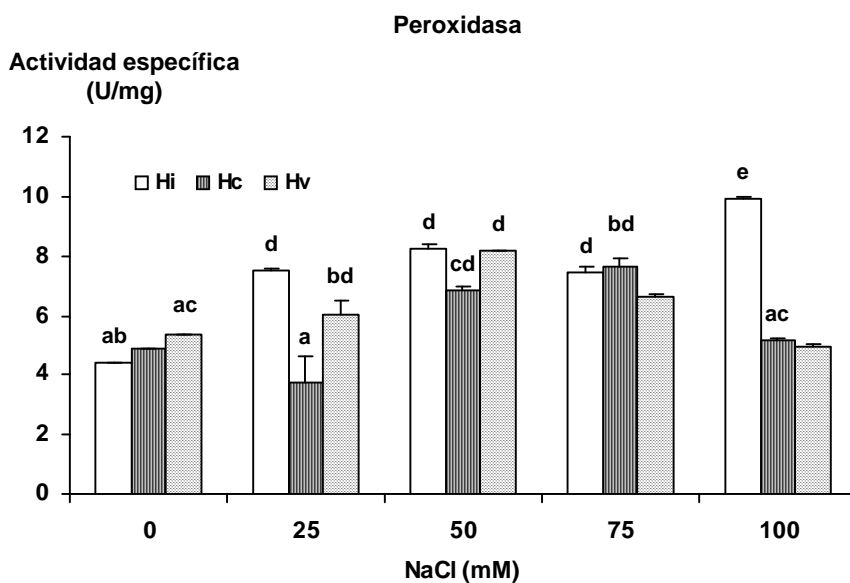
los estudios realizados por Rahnama et al. (2003), en cuatro cultivares de *S. tuberosum* sometidos a estrés salino (entre 0 y 150 mM de NaCl), se observaron cambios en la actividad catalasa en dependencia de la variedad.

En la actividad peroxidasa se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de cloruro de sodio y el tipo de explante (fig. 3). Se observó un incremento de dicha actividad hasta 50 mM; a partir de esta concentración disminuyó progresivamente hasta 100 mM, con excepción de los callos provenientes de hipocótilos.

Varios autores han hecho referencia a la correlación entre la respuesta de las enzimas antioxidantes (como las peroxidases) y la tolerancia a las condiciones de estrés abiótico (Hassanein, Ahmed, Abed-El-Hafez y Soltan, 1999; El-Tayeb y Hassanein, 2000). Hassanein (2004) evaluó la actividad enzimática de varias enzimas detoxificadoras en callos inducidos, en condiciones de estrés hídrico y salino (176 mM de NaCl), en dos especies de plantas con dife-

En la peroxidase activity statistically significant differences were obtained between the concentration of sodium chloride and the type of explant (fig. 3). An increase of this activity was observed until 50 mM; from this concentration it decreased progressively until 100 mM, with the exception of the calluses from hypocotyls.

Several authors have referred to the correlation between the response of antioxidant enzymes (such as peroxidases) and the tolerance to abiotic stress conditions (Hassanein, Ahmed, Abed-El-Hafez and Soltan, 1999; El-Tayeb and Hassanein, 2000). Hassanein (2004) evaluated the enzymatic activity of several detoxifying enzymes in induced calluses, under hydric and saline stress conditions (176 mM of NaCl), in two plant species with different tolerance levels: *A. graecorum* (tolerant) and *L. esculentum* L. (sensitive); this author detected increases in the peroxidase activity of the species under both stressing conditions, motivated by the activation of new isoforms with regards to the control and



a,b,c,d,e Letras diferentes indican diferencias significativas según test de rangos múltiples de SNK ($P < 0,05$)

Fig. 3. Actividad peroxidasa en callos obtenidos a partir de diferentes explantes de *S. guianensis* cv. CIAT-184.

Fig. 3. Peroxidase activity in calluses obtained from different explants of *S. guianensis* cv. CIAT-184.

rentes niveles de tolerancia: *A. graecorum* (tolerante) y *L. esculentum* L. (sensible); este autor detectó incrementos en la actividad peroxidasa de las especies en ambas condiciones estresantes, motivado por la activación de nuevas isoformas en relación con el control y por los incrementos en la expresión de algunas isoenzimas, que mostraron bandas con mayor intensidad en la tinción. Sin embargo, el porcentaje de incremento en la actividad fue mucho mayor en los callos de *A. graecorum*, especie catalogada como tolerante a ambas condiciones. Hossain et al. (2007) obtuvieron resultados similares en regenerantes de *Ch. morifolium*, obtenidos a partir de callos tolerantes que fueron subcultivados en concentraciones cada vez mayores de NaCl. En otras especies, como *S. tuberosum* (Rahnama et al., 2003), la actividad peroxidasa sólo mostró incrementos en condiciones moderadas de salinidad.

La actividad enzimática específica se relacionó con el contenido de proteína de las muestras analizadas. Las proteínas totales en el sobrenadante de los callos de Stylo 184, después de la maceración en frío y centrifugación, mostraron un comportamiento homogéneo para las diferentes variantes de salinidad y explantes (fig. 4).

by the increases in the expression of some isoenzymes, which showed strips with higher intensity in the staining. Nevertheless, the increase percentage in the activity was much higher in the calluses of *A. graecorum*, species considered tolerant to both conditions. Hossain et al. (2007) obtained similar results in regenerants of *Ch. morifolium*, obtained from tolerant calluses that were sub-cultivated in progressively higher concentrations of NaCl. In other species, such as *S. tuberosum* (Rahnama et al., 2003), the peroxidase activity only showed increases under moderate conditions of salinity.

The specific enzymatic activity was related to the protein content of the samples analyzed. The total proteins in the supernatant of the calluses of Stylo 184, after the cold maceration and centrifugation, showed a homogeneous performance for the different variants of salinity and explants (fig. 4).

This result could have been due to the changes in the expression of numerous genes under the influence of sodium chloride. Sairam and Tyagi (2004) found abundant evidence of changes in the gene expression of plants subject to different abiotic factors. In this sense, while certain processes that imply an active synthesis of

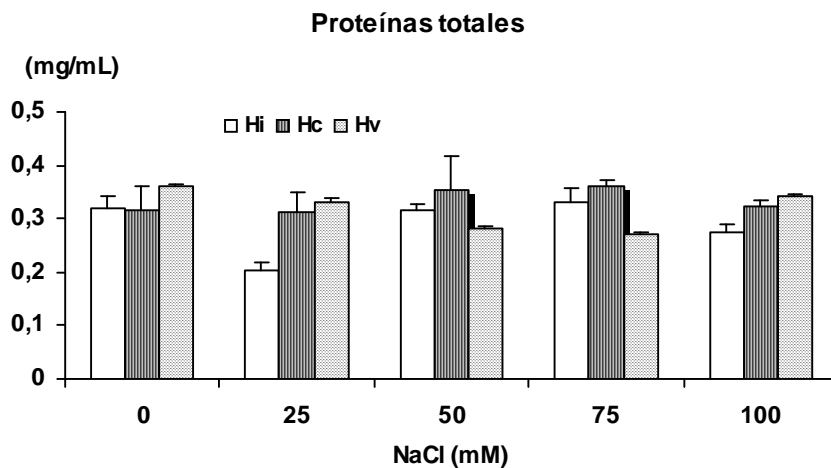


Fig. 4. Contenido de proteínas totales en callos de *S. guianensis* CIAT-184, de 21 días de inducidos en diferentes condiciones de salinidad.

Fig. 4. Content of total proteins in calluses of *S. guianensis* cv. CIAT-184, 21 days after being induced under different salinity conditions.

Este resultado pudiera deberse a los cambios en la expresión de numerosos genes bajo la influencia del cloruro de sodio. Sairam y Tyagi (2004) encontraron numerosas evidencias de cambios en la expresión génica de plantas sometidas a diferentes factores abióticos. En este sentido, mientras determinados procesos que implican una síntesis activa de proteínas (como la división celular) son afectados total o parcialmente por el estrés osmótico debido a la presencia de cloruro de sodio en el medio (Xiong y Zhu, 2002), otro grupo importante de proteínas podrían ser sobreexpresadas. Entre estas se encuentran las enzimas antioxidantes como mecanismo para eliminar los radicales libres del oxígeno, cuyos niveles son exacerbados bajo el efecto del estrés salino (Hernández, Jiménez, Mullineaux y Sevilla, 2000), así como enzimas ATPasas, transportadores proteicos de iones y acuaporinas para mantener la homeostasis iónica intracelular (Xiong y Zhu, 2002).

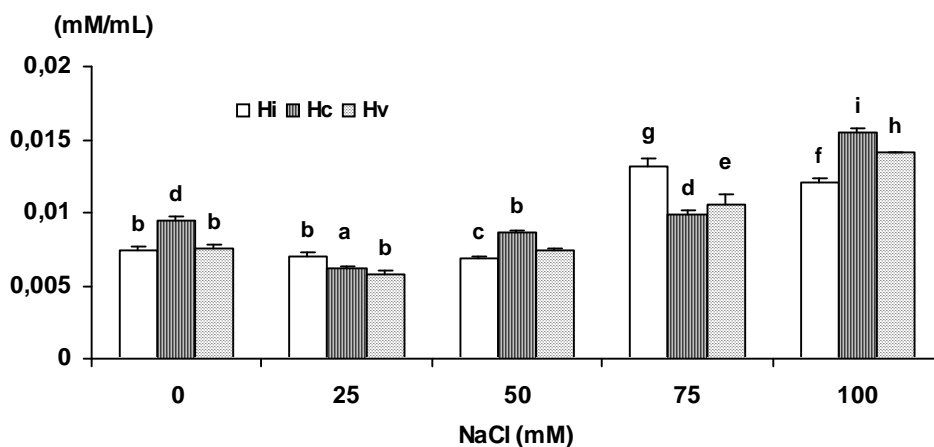
Por otra parte, los carbohidratos totales en los distintos tratamientos mostraron un incremento para las mayores concentraciones de salinidad (75 y 100 mM) en todas las variantes de explantes (fig. 5).

proteins (such as cellular division) are totally or partially affected by the osmotic stress due to the presence of sodium chloride in the medium (Xiong and Zhu, 2002), another important group of proteins could be over-expressed. Among them are antioxidant enzymes as mechanism for eliminating the free radicals of oxygen, which levels are exacerbated under the effect of saline stress (Hernández, Jiménez, Mullineaux and Sevilla, 2000) as well as ATPase enzymes, protein carriers of ions and aquaporins to maintain the intracellular ionic homeostasis (Xiong and Zhu, 2002).

On the other hand, total carbohydrates in the different treatments showed an increase for the highest concentrations of salinity (75 and 100 mM) in all the variants of explants (fig. 5).

The increase in carbohydrates as the saline concentration of the medium increased could have been caused by diverse factors. The considerable accumulation of starch in tissues cultivated in media for the induction of organogenic processes, was reported by Mangat, Pelekis and Cassels (1990) and Fortes and Pais (2000). The organogenesis is a high energy consuming process, which is obtained from the

Carbohidratos totales



a,b,c,d,e,f,g,i,h Letras diferentes indican diferencias significativas según test de rangos múltiples de SNK ($P < 0,05$)

Fig. 5. Contenido de carbohidratos totales en callos de *S. guianensis* CIAT-184, a los 21 días.

Fig. 5. Content of total carbohydrates in calluses of *S. guianensis* cv. CIAT-184, at 21 days.

El aumento en los carbohidratos en la medida que se incrementó la concentración salina del medio, pudo ser ocasionado por diversos factores. La acumulación considerable de almidón en tejidos cultivados en medios para la inducción de procesos organogénicos fue informada por Mangat, Pelekis y Cassels (1990) y Fortes y Pais (2000). La organogénesis es un proceso altamente consumidor de energía, la cual se obtiene a partir de la degradación del almidón, ya que se producen intermediarios glicolíticos que pueden ser catabolizados para producir gran cantidad de ATP. Los estudios realizados en diferentes especies, como: *Nicotiana tabacum* (Thorpe, Joy y Leung, 1986), *Manihot esculenta* (Stamp, 1987) y *Humulus lupulus* (Fortes y Pais, 2000), han demostrado este hecho.

Por otra parte, se ha referido la posibilidad de que el tejido sometido a estrés por salinidad, sintetice determinados azúcares para compensar la diferencia de potencial osmótico entre el medio intracelular y el extracelular (Sairam y Tyagi, 2004).

Los cambios en la concentración de carbohidratos y en la actividad enzimática catalasa y peroxidasa, tanto en plántulas como en callos de *S. guianensis* cv. CIAT-184 obtenidos en condiciones salinas, pueden constituir una parte del mecanismo fisiológico de defensa frente a este estrés, por lo que debe considerarse su pesquisar en futuros estudios de selección de somaclones con tolerancia a la salinidad.

Conclusiones

La actividad catalasa fue mayor en las hojas verdaderas que en el resto de los explantes, aunque en los tres casos aumentó hasta 50 mM de NaCl y después decreció progresivamente. Entre los explantes, los hipocótilos fueron los de mayor actividad peroxidasa, los cuales mostraron incrementos sostenidos hasta 100 mM de NaCl; mientras que en las hojas cotiledonales y verdaderas la actividad decreció a partir de 75 mM. No se detectaron cambios sustanciales en la concentración de proteínas totales; mientras que en los carbohidratos hubo un incremento considerable con las mayores concentraciones

de degradación de almidón, porque glicolíticos intermediarios se producen que pueden ser catabolizados para producir una gran cantidad de ATP. Los estudios realizados en diferentes especies, como *Nicotiana tabacum* (Thorpe, Joy y Leung, 1986), *Manihot esculenta* (Stamp, 1987) y *Humulus lupulus* (Fortes y Pais, 2000), han demostrado este hecho.

Por otra parte, se ha referido la posibilidad de que el tejido sometido a estrés por salinidad, sintetice determinados azúcares para compensar la diferencia de potencial osmótico entre el medio intracelular y el extracelular (Sairam y Tyagi, 2004).

Los cambios en la concentración de carbohidratos y en la actividad enzimática catalasa y peroxidasa, tanto en plántulas como en callos de *S. guianensis* cv. CIAT-184 obtenidos en condiciones salinas, pueden constituir una parte del mecanismo fisiológico de defensa frente a este estrés, por lo que debe considerarse su pesquisar en futuros estudios de selección de somaclones con tolerancia a la salinidad.

Conclusions

The catalase activity was higher in the true leaves than in the rest of the explants, although in the three cases it increased up to 50 mM of NaCl and decreased progressively afterwards. Among the explants, the hypocotyls were the ones with the highest peroxidase activity, which showed sustained increases up to 100 mM of NaCl; while in the cotyledonal and true leaves the activity decreased from 75 mM. No substantial changes were detected in the concentration of total proteins; while in carbohydrates there was a remarkable increase with the highest concentrations of sodium chloride, which could be related to the accumulation of protecting osmolytes.

--End of the English version--

of sodium chloride, which could be related to the accumulation of protecting osmolytes.

Referencias bibliográficas

- Chance, B. & Machley, A. 1955. Assays of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 2:764
- Consoli, L.; Vieira, M.L.C.; Lopes de Souza, C.Jr. & García, A.A.F. 1996. Tissue culture effects on quantitative traits in *Stylosanthes guianensis* (Leguminosae). *Brazilian Journal of Genetics.* 19 (3):469
- Dubois, M.K.; Gilles, A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350
- El-Enany, A.E. 1995. Shoot organogenesis and protein synthesis in tomato stressed cultures. *Journal of Islamic Academy of Sciences.* 8 (3):137
- El Tayeb, M.A. & Hassanein, A.M. 2000. Germination, seedling growth, some organic solutes and peroxides expression of different *Vicia faba* lines as influenced by water stress. *Acta Agronomica Hungarica.* 48:11
- Fortes, A.M. & Pais, M.S. 2000. Organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget (*Cannabaceae*): histological studies and changes in the starch content. *American Journal of Botany.* 87:971
- Fuentes, Leticia; Mesa, A.R.; Ruíz, María L.; Peláez de Lucas, María I. & Fernández, Martha. 2005. Estudio histológico en callos de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184. *Pastos y Forrajes.* 28 (3):199
- Gueta-Dahan, Y.; Yaniv, Z.; Zilinskas, B.A. & Ben-Hayyin, G. 1997. Salt and oxidative stress: similar and specific response and their relation to salt tolerance in citrus. *Planta.* 203:460
- Hassanein, A.M. 2004. Effect of relatively high concentration of mannitol and sodium chloride on regeneration and gene expression of stress tolerant (*Alhagi graecorum*) and stress sensitive (*Lycopersicon esculentum* L.) plant species. *Bulg. J. Plant. Physiol.* 30 (3-4):19
- Hassanein, A.M.; Ahmed, A.M.; Abed-El-Hafez, A.I.I. & Soltan, D.M. 1999. Phenol-oxidizing isoenzymes, malate dehydrogenase patterns and organogenesis of *Solanum nigrum*, as affected by light treatments. *Acta Hungarica.* 47:127
- Hernández, J.A.; Jiménez, A.; Mullineaux, P. & Sevilla, P.F. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum*) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Biol.* 23:853
- Hossain, Z.; Azad, A.B.; Dattaa, S.K. & Biswas, A.K. 2007. Development of NaCl-tolerant line in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through shoot organogenesis of selected callus line. *J. of Biotechnology* 10:658
- Kruskal, W.H. & Wallis, W.A. 1952. Use of ranks in one criterion analysis of variance. *J. Amer. Statis. Assoc.* 47:583
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.H.; Farr, A.L. & Randall, R.J. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:225
- Mangat, B.S.; Pelekis, M.K. & Cassels, A.C. 1990. Changes in the starch content during organogenesis *in vitro* cultured *Begonia rex* stem explants. *Physiologia Plantarum.* 79:269
- Meijer, E.G.M. 1982. Shoot formation in tissue cultures of three cultivars of the tropical pasture legume *Stylosanthes guyanensis* (Aubl.) Sw. *Z. Pflanzenzuchtg.* 89:169
- Mroginski, L.A. & Kartha, K.K. 1981. Regeneration of plants from callus tissue of the forage legume *Stylosanthes guianensis*. *Plant Science Letters.* 23:245
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.* 15:473
- Pandey, R. & Ganapathy, P.S. 1985. The proline enigma: NaCl-tolerant and NaCl-sensitive callus lines of *Cicer arietinum*. *Plant Science.* 40:13
- Pierik, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid
- Quecini, V.M.; Oliveira, C.A. de; Alves, A.C. & Vieira, M.L.C. 2002. Factors influencing electroporation-mediated gene transfer to *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. protoplasts. *Genetics and Molecular Biology.* 25 (1):73
- Rahnama, H.; Ebrahimzadeh, H. & Ghareyazie, B. 2003. Antioxidant enzymes responses to NaCl stress in calli of four potato cultivars. *Pakistan Journal of Botany.* 35 (4):579
- Sairam, R.K. & Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science.* 86 (3):407
- Sigarroa, A. 1985. Biometría y diseño experimental. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. 743 p.
- Sreenivasulu, N.; Grimm, B.; Wobus, U. & Weschke, W. 2000. Differential response of antioxidant components to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). *Physiol. Plant.* 109:435
- Stamp, J.A. 1987. Somatic embryogenesis in cassava: the anatomy and morphology of the regeneration process. *Annals of Botany.* 57:451

- Thorpe, T.A.; Joy, R.W. & Leung, D.W.. 1986. Starch turnover in shoot-forming tobacco callus. *Physiologia Plantarum*. 66:58
- Valarini, M.J.; Otsuk, I.P. & Vieira, M.L.C. 1997. Changes in N₂ fixation in *Stylosanthes scabra* derived from tissue culture. *Brazilian Journal of Genetics*. 20 (4):713
- Xiong, L. & Zhu, J.K. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment*. 25:131
- Zhu, J.K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*. 6:66

Recibido el 4 de octubre del 2007
Aceptado el 13 de diciembre del 2007