

## Anatomía foliar de plantas de pimentón (*Capsicum annuum* L.) sometidas a estrés salino

### Leaf anatomy in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under saline stress

R.E. Valera y G.R. García

Departamento de Ciencias Biológicas, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Apartado 400. Barquisimeto, estado Lara, Venezuela.

#### Resumen

Las plantas desarrollan mecanismos fisiológicos y/o anatómicos que reducen el efecto adverso de las sales. Se evaluó la influencia del estrés salino sobre la anatomía foliar del pimentón (*Capsicum annuum* L.) en plantas sembradas en bandejas y regadas con NaCl y agua destilada. Se seccionaron tercios medios de la hoja para estudios bajo microscopio óptico. Las muestras sometidas a estrés presentaron mayor grosor de la lámina, respecto al testigo. La densidad estomática se redujo en relación al testigo y el índice estomático (IE) fue similar en ambos tratamientos. El aumento en la succulencia de la lámina foliar y la permanencia del IE, podrían contribuir a reducir el efecto adverso de las sales sobre la condición hídrica de la planta.

**Palabras clave:** salinidad, anatomía foliar, *Capsicum annuum*.

#### Abstract

Plants have physiological and/or anatomical mechanism to reduce adverse effect of salts. Influence of saline stress on leaf anatomy in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) was evaluated. Plants were set in trays and watered with NaCl (50 mM) or water. Leaf middle thirds were obtained for performing the microscope observation. Leaf under saline stress showed higher width lamina, when compared to control. Stomatal density was reduced in relation to no salinized plants meanwhile stoma index (SI) was similar in both groups. Increasing in leaf lamina succulence and unchanged SI could contribute to reduce adverse effect of salts under water condition in plants.

**Key words:** salinity, leaf anatomy, *Capsicum annuum*.

## Introducción

Los principales factores abióticos que causan estrés en las plantas, implicando variaciones estructurales son el déficit o exceso de agua (Quintana *et al.*, 2012), alta concentración salina en los suelos (Garzón y García, 2011) e irradiancia (Valera *et al.*, 2007); estos factores además ocasionan restricciones en el crecimiento del vegetal y en la productividad de los cultivos. Las plantas cultivadas presentan diferente grado de sensibilidad ante la salinidad, lo cual depende de la capacidad para desarrollar mecanismos fisiológicos y/o anatómicos que reducen el efecto adverso de las sales (Hussein *et al.*, 2010). Considerando que el pimentón es un cultivo moderadamente sensible a las sales (Maas, 1990), se evaluó la influencia del estrés salino, sobre la anatomía foliar de esta especie (*C. annuum* L. cv. Capistrano) en su fase juvenil.

## Materiales y métodos

Las plantas utilizadas provenían de 50 semillas de pimentón (*C. annuum* L. cv. Capistrano) sembradas en bandejas con un sustrato de arena, cascarilla de arroz y tierra negra y se formaron dos grupos de 25 plantas cada uno, el primero fue regado con una solución de NaCl (50 mM) cada dos días, durante 20 días, a partir de la siembra y al segundo se le aplicó solo agua destilada. Se seleccionaron nueve plantas por tratamiento, tomando como muestra la primera hoja verdadera; se fijaron en FAA (formaldehído, ácido acético y alcohol al 75%) los tercios medios de la lámina foliar para el

## Introduction

The main abiotic factors that cause stress in the plants, including the structural variations, are the deficit or excess of water (Quintana *et al.*, 2012), high salt concentration in the soils (Garzón and García, 2011) and irradiance (Valera *et al.*, 2007); these factors also provoke restrictions in the vegetal growth and the productivity of the crops.

Cultivated plants have varying degrees of sensitivity towards salinity, which depends on the capacity to develop physiological or anatomical mechanisms that reduce the adverse effect of salts (Hussein *et al.*, 2010). Considering that the pepper crop is moderately sensitive to salts (Maas, 1990), it was evaluated the influence of saline stress, on the leaf anatomy of this species (*C. annuum* L. cv. Capistrano) on its juvenile phase.

## Materials and methods

The plants used came from 50 seeds of pepper (*C. annuum* L. cv. Capistrano) sown in trays with a substrate of sand, rice husks and black earth and formed into two groups of 25 plants each, the first was washed with a NaCl solution (50 mM) every two days during 20 days, from the planting and the second only distilled water was applied. Nine plants were selected for treatment, taking as the sample the first true leaf; were fixed in FAA (formaldehyde, acetic acid and alcohol to 75%) the thirds of foliar blade for the corresponding processing. Cuts were made to obtain cross sections and were stained with blue tolouidine (5%); there were a total of six semi-

procesamiento correspondiente. Se hicieron cortes a mano alzada para obtener secciones transversales y fueron teñidas con azul de toluidina (5%); se realizaron un total de seis montajes semipermanentes por tratamiento en agua:glicerina (1:1) y las preparaciones fueron selladas con esmalte transparente para uñas (Parés *et al.*, 2008). Para obtener vistas frontales de las epidermis, se realizaron aclarados en porciones de 1 cm<sup>2</sup> de láminas foliares, sometidos a una solución de cloro comercial (10%), aplicándose calor para acelerar el proceso y se mantuvieron así hasta que se observaron completamente transparentes. Posteriormente, se lavaron con abundante agua destilada, aplicando la misma tinción y montaje descrita anteriormente. Las variables consideradas en sección transversal consistieron en grosor de células epidérmicas adaxiales y abaxiales, del mesofilo y de la lámina y en vista frontal se midió la densidad e índice estomático. En cada repetición se realizaron tres observaciones al microscopio óptico con un objetivo de 40X, obteniendo imágenes utilizando el software Motic Image Plus 2.0 y las mediciones empleando el programa Image J. 1.44. Las variables consideradas fueron sometidas a un análisis de varianza y prueba de medias de Tukey al 5% mediante el programa Statistix 8.0.

## Resultados y discusión

Los valores obtenidos permitieron observar que las hojas de las plantas sometidas a estrés salino, fueron más gruesas respecto al grupo testigo y esta variable se correspondió con una ma-

permanent mounts by treatment in water: glycerine (1:1) and the preparations were sealed with transparent enamel for nails (Parés *et al.*, 2008). To obtain front view of the epidermis, clarified in portions of 1 cm<sup>2</sup> of leaf blades were done, subjected to a commercial solution of chlorine (10%), applying heat to accelerate the process and remained there until they were observed completely transparent. Subsequently, they were washed with distilled water, applying the same staining and mounting described above. The variables considered in cross section consisted of thickness of epidermal adaxials and abaxial cells, mesophyll and blade and in the front view; the density and stomatal index were measured.

In each replicate three observations in the optical microscope with a 40 X objective were done, getting images using Motic Image Plus 2.0 software and measurements using the program Image J. 1.44. The variables considered were subjected to variance analysis and Tukey test at 5% using the Statistix 8.0 program.

## Results and discussion

The values allowed to observe plant leaves subjected to salt stress were thicker on the control group and this variable corresponded to a greater abaxial epidermis (20 μm) and thicker mesophyll (134 μm) (figure 1A, B, 2A, B, and C), reflecting an increment in the succulence of the leaf lamina (figure 3D). The stomatic density (DE) was significantly reduced in the abaxial surface (figure 3A and B, and 2E) and could not relate to the adaxial

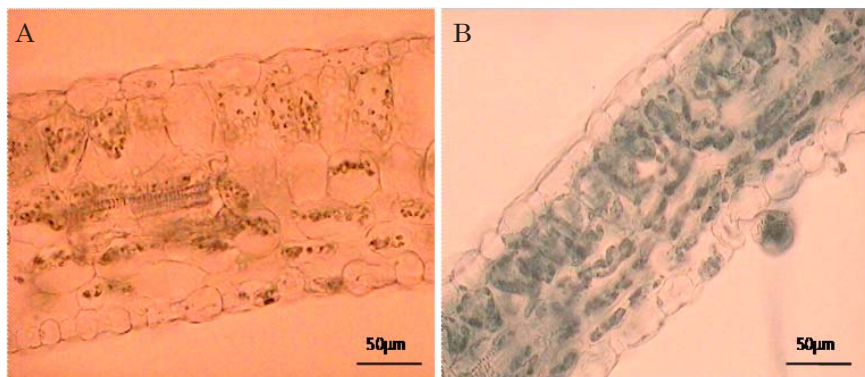
por epidermis abaxial ( $20\ \mu\text{m}$ ) y mesofilo más grueso ( $134\ \mu\text{m}$ ) (figura 1A y B, y 2A, B y C), reflejando así un aumento en la succulencia de la lámina foliar (figura 2D). La densidad estomática (DE) se redujo considerablemente en la superficie abaxial (figura 3A y B, y 2E) y no se pudo relacionar con la adaxial por tratarse de hojas hipostomáticas. El IE fue similar en ambos tratamientos, indicando que el estrés salino afectó tanto el número de estomas como del resto de células epidérmicas por unidad de área, pero mantuvo la relación entre éstos (figura 2F).

Las variables anatómicas relacionadas con la succulencia de lámina y con la transpiración en la superficie foliar, podrían estar asociadas con el comportamiento moderadamente sensible de este cultivo (Maas, 1990). Estos resultados se asociaron con una mayor disponibilidad del recurso

by being hypostomatic leaves. The IE was similar in both treatments, indicating that the saline stress affected both the number of stomata and the rest of epidermal cells per unit area, but maintained the relationship between these (figure 2F).

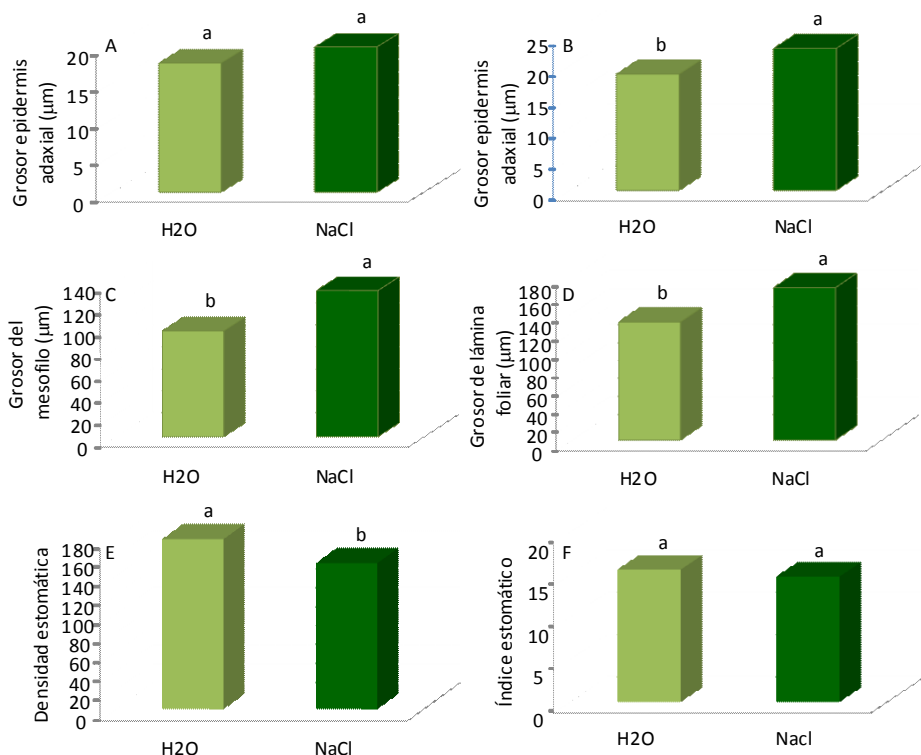
The anatomical variables related to the lamina succulence and with the transpiration in the leaf surface may be associated with the behavior of this moderately sensitive crop (Maas, 1990). These results were associated with a higher availability of water resources, which has been considered favorable in saline stress conditions (Garzón and Garcia, 2011).

The increase in the salinity of irrigation water, decreased in the surface of the leaves. A similar behavior was noted by Abbas *et al.* (2013) in pepper plants irrigated with salt water ( $4\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NaCl}$ ), Parés *et al.* (2008) in papaya leaves (*Carica papa-*



**Figura 1. Sección transversal del tercio medio de la lámina foliar de pimentón (*Capsicum annuum* L. cv. Capistrano). (A) Tratamiento salino y (B) Testigo. 40X.**

**Figure 1. Transversal section of the foliar lamina in pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Capistrano). (A) Saline treatment and (B) Witness. 40X.**



**Figura 2.** Grosor de la epidermis adaxial (A) y abaxial (B), grosor del mesofilo (C) y de la lámina (D), densidad estomática (E) e índice estomático (F) en las láminas foliares de las hojas pimentón (*Capsicum annuum* L. cv. Capistrano). Tratamiento salino (NaCl) y testigo (H<sub>2</sub>O).

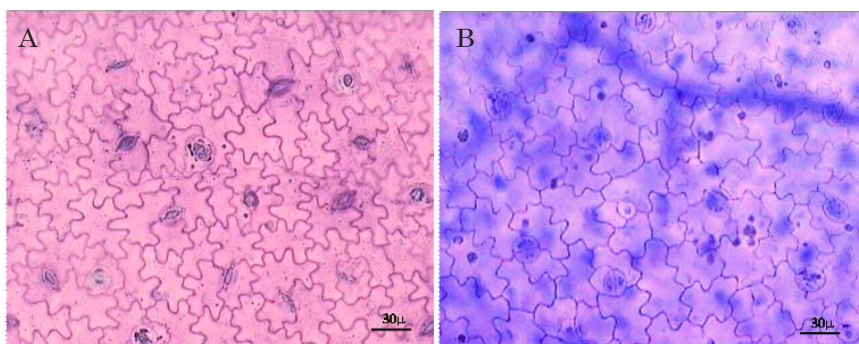
**Figure 2.** Thickness of the adaxial (A) and abaxial (B) epidermis, thickness of the mesophyll (C) and lamina (D), stomatic density (E) and stomatic index (F) in the foliar laminas of pepper leaves (*Capsicum annuum* L. cv. Capistrano). Saline treatment (NaCl) and witness (H<sub>2</sub>O).

hídrico, lo cual se ha considerado favorable en condiciones de estrés salino (Garzón y García, 2011).

El incremento de la salinidad del agua de riego, disminuyó la DE en la superficie de las hojas. Un comportamiento similar fue señalado por Abbas *et al.* (2013) en plantas de pimentón irrigadas con agua de sal (4 g.L<sup>-1</sup> NaCl),

ya) subjected to salinity (2.0 ; 4.0 and 8.0 dS.m<sup>-1</sup>), Benavides *et al.* (2004) in corn (*Zea mays*), and Quintana *et al.* (2012) in pineapple (*Ananas comosus*).

However, these results differ from those found by Garzon and Garcia (2011) in cowpea (*Vigna unguiculata*), where was observed a slight increase in the DE by effect of this stress.



**Figura 3. Vista frontal de la lámina foliar de hojas de pimentón (*Capsicum annuum* L. cv. Capistrano). (A) Con tratamiento salino y (B) testigo. 40X.**

**Figure 3. Front view of the foliar lamina of pepper leaves (*Capsicum annuum* L. cv. Capistrano). (A) With saline treatment and (B) Witness. 40X.**

Parés *et al.* (2008) en hojas de lechosa (*Carica papaya*) sometidas a salinidad (2,0; 4,0 y 8,0 dS.m<sup>-1</sup>), Benavides *et al.* (2004) en maíz (*Zea mays*), y Quintana *et al.* (2012) en piña (*Ananas comosus*). Sin embargo, estos resultados difirieron de los encontrados por Garzón y García (2011) en frijol (*Vigna unguiculata*), donde observaron un ligero aumento en la DE por efecto de este estrés. Se podría inferir que la reducción del número de estomas y de células epidérmicas típicas observadas en las plantas de pimentón estresadas, respondieron a la inhibición de la actividad inicial de división celular que podrían causar las sales (Hussein *et al.*, 2010).

## Conclusión

El aumento en la succulencia de las hojas expresado por el incremento de la lámina foliar, de ambas epidermis y mesofilo, así como la capacidad

It might be inferred that the reduction in the number of stomas and typical epidermal cells observed in the stressed plants of pepper, answered to the inhibition of the initial activity of the cellular division that the salt might cause (Hussein *et al.*, 2010).

## Conclusions

The increment in the succulence of leaves expressed by the increase of the leaf blade of both epidermis and mesophyll, as well as the ability to maintain the IE, could help to reduce the adverse effect of salts on the water status of pepper plants in juvenile phase, when they were subjected to salt stress. These anatomic variations could be related to the moderately sensitive behavior to salts that has been described in this horticultural species.

*End of english version*

de mantener el IE, podría contribuir a reducir el efecto adverso de las sales sobre la condición hídrica de las plantas de pimentón en estado juvenil, cuando fueron sometidas a estrés salino. Estas variaciones anatómicas podrían relacionarse con el comportamiento moderadamente sensible a las sales que ha sido descrito en esta especie hortícola.

## Literatura citada

- Abbas S., H.H. Latify E.A. Elsherbiny. 2013. Effect of 24-epibrassinolide on the physiological and genetic changes on two varieties of pepper under salt stress conditions. *Pak. J. Bot.* 45(4):1273-1284.
- Benavides, A., R. Dávila, F. Rincón, H. Ramírez y L. Fuentes. 2004. Respuesta de la densidad estomática y de células tabulares de maíces bajo estrés por NaCl. [http://uaaa.mx/DirInv/Result\\_Pio4/MEMORIA\\_2004/IngAgrícola/ABenavidesMendoza2.doc](http://uaaa.mx/DirInv/Result_Pio4/MEMORIA_2004/IngAgrícola/ABenavidesMendoza2.doc).
- Garzón, P. y M. García. 2011. Efecto del estrés por NaCl sobre la anatomía radical y foliar de dos genotipos de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walt.). *Bioagro* 23(3):153-160.
- Hussein, K., A. Majeed, K. Nawaz, F. Khan, S. Afghan y K. Ali. 2010. Comparative study for salt stress among seed, root stock and direct regenerated violet (*Viola odorata* L.) seedlings in relation to growth, ion contents and enzyme activities. *Afr. J Biotechnol.* 9(14):2108-2117.
- Maas, E. 1990. Crop salt tolerance. pp. 262-304. En: Agricultural salinity assessment and management. K. Tanji (Ed.). American Society of Civil Engineers. New York, USA.
- Parés, J., M. Arizaleta, M.E. Sanabria y G. García. 2008. Efecto de los niveles de salinidad sobre la densidad estomática, índice estomático y el grosor foliar en plantas de *Carica papaya* L. *Acta Botánica Venezuelica* 31:27-34.
- Quintana, C., M.E. Sanabria, M. Ojeda y R. Valera. 2012. Efecto de la salinidad sobre la anatomía foliar y radical de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) 'Española Roja'. *Pittieria* 36:87-108.
- Valera R., N. Maciel, M.E. Sanabria y A. Mendoza. 2007. Efecto de la irradiancia sobre la anatomía foliar de *Sabal mauritiiiformis* (Krass) Grises & Wendl. *Rev. Fac. Agr. (LUZ)*. 24(Supl. 1):141-147.