

EFFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE CRECIMIENTO, PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS Y ACTIVIDAD PEROXIDASA EN PLANTAS DE CRISANTEMO

Martha Elena Mora-Herrera¹; Jezabel Peralta-Velázquez¹; Humberto Antonio López-Delgado²;
Rómulo García-Velasco¹, Justino Gerardo González-Díaz¹.

¹Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México. km 1.5, Carretera Tenancingo-Villa Guerrero, Estado de México, C.P. 52400, MÉXICO. Tel. 01 714 140 77 24, Ext. 176, FAX. 01 714 140 77 25,

Correo-e: marthaelenam@gmail.com (¹Autor para correspondencia)

²Programa Nacional de Papa, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Metepec, Estado de México, C. P. 52141. MÉXICO.

RESUMEN

Los cultivos enfrentan problemas en el manejo agronómico y sufren enfermedades, lo que incrementa los costos y la contaminación ambiental. El ácido ascórbico (AA) es un compuesto antioxidante que induce respuestas relacionadas al crecimiento en las plantas para enfrentar el estrés. Se evaluó el efecto del AA en plantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) cultivar Polaris en condiciones de invernadero. Las plantas se asperjaron dos veces por semana con 0, 3.4 y 6.8 mM de AA a partir de los 30 días de cultivo y hasta la cosecha (100 días de cultivo). El AA incrementó significativamente la longitud del tallo, peso seco, número de botones y tallos por planta con respecto al testigo sin aplicación de AA, siendo el mejor tratamiento la concentración de 6.8 mM de AA el que incrementó la biomasa. Asimismo, el AA incrementó significativamente el contenido de proteína (36 %), pigmentos fotosintéticos totales (75 %) y actividad enzimática de la peroxidasa (33 %), con respecto al testigo, respuestas que se asociaron a los parámetros de crecimiento evaluados.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: *Dendranthema grandiflora*, crecimiento, contenido de proteína, actividad antioxidante.

EFFECT OF ASCORBIC ACID ON GROWTH, PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS AND PEROXIDASE ACTIVITY OF CHRISANTEMUM PLANTS

ABSTRACT

Crops face problems of agronomic management and diseases, increasing costs and environmental contamination. Ascorbic acid (AA) is an antioxidant compound which induces plant growth-responses to cope with stress. The effect of AA on chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) cv. Polaris under greenhouse condition was evaluated. Plants were sprayed twice a week with 0, 3.4 and 6.8 mM of AA from 30 days after transplant up to harvest time (100 days after transplant). AA significantly increased shoot length, dry weight, number of floral buds and stems per plant in contrast with control, being 6.8 mM the best treatment which enhanced biomass. AA significantly enhanced protein content (36 %), total photosynthetic pigments (75 %) and peroxidase activity (33 %) respecting the control, these responses were associated to the evaluated growth parameters.

ADDITIONAL KEY WORDS: *Dendranthema grandiflora*, growth, protein content, antioxidative activity.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la agricultura es altamente dependiente de insumos y pesticidas sintéticos, los cuales contrarrestan el ataque de plagas y patógenos y coadyuvan a incrementar la producción. Los cambios ambientales, uso de cultivares susceptibles, desgaste de suelos y contaminación obligan a modificar continuamente las prácticas de manejo de los cultivos, lo que incide en un incremento de los costos y aumenta la contaminación ambiental (Vásquez, 2008). Estos problemas han obligado a la búsqueda de alternativas para el manejo integrado de los cultivos como: control biológico, variedades resistentes, plantas transgénicas y abonos orgánicos, entre otras (Zavaleta-Mejía *et al.*, 2003). En algunos cultivos de importancia alimenticia como la papa, se han venido estudiando nuevas opciones para incrementar la producción a través de las respuestas oxidativas y antioxidativas naturales en las plantas, para ser usadas y manipuladas en el manejo integrado de los cultivos (Mora-Herrera y López-Delgado, 2007; Romero-Romero y López-Delgado, 2009).

El estrés aumenta el estado de oxidación de la célula, lo cual induce un incremento en la síntesis de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para contrarrestar los efectos de dicha oxidación. Los principales antioxidantes enzimáticos son: peroxidasas (POX), catalasa, superóxido dismutasa y glutatión S-transferasa. Los antioxidantes no enzimáticos más importantes son: ácido ascórbico (AA, vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutatión y β -carotenos (Scandalios, 2005).

Se ha encontrado que algunos compuestos relacionados con las respuestas oxidativas y antioxidativas originadas por factores de estrés, como el ácido ascórbico, están involucrados en las respuestas de tolerancia a estrés biótico y abiótico y desarrollo óptimo (Shen y Yeh, 2010).

El ácido ascórbico está presente en cloroplastos, citosol, vacuolas y espacio apoplástico. El AA es quizás el antioxidante no enzimático más importante en las plantas, que participa en la defensa contra el estrés oxidativo biótico y abiótico por su función en la degradación del H_2O_2 vía el ciclo del glutatión-ascorbato (Smirnoff, 1996).

El AA participa en muchos procesos fisiológicos tales como: fotosíntesis, cofactor enzimático, homeostasis del sistema redox, como precursor en las rutas de síntesis de moléculas del metabolismo primario y secundario (Smirnoff, 1996) y regulador de POX (Sánchez *et al.*, 1997; Stasolla y Yeung, 2007). Además está involucrado en el crecimiento, desarrollo y modulación del ciclo celular y/o división celular y la elongación celular (De Pinto y De Gara, 2004). Existen evidencias de que el AA aplicado exógenamente en algunos cultivos promueve el crecimiento, lo que lleva a un mejor rendimiento (El-Tohamy *et al.*, 2008); y esto está asociado con un incremento en los pigmentos fotosintéticos como: en canola (Sakr y Arafa, 2009), papa (Romero-Romero y López-Delgado, 2009) y berenjena (Add-EIAziz *et al.*,

INTRODUCTION

Today, agriculture is highly dependent of inputs and synthetic pesticides, which to counteract the attack of plagues and pathogens and contribute to increase the yield, environmental changes, use of susceptible cultivars, soil erosion and pollution forces to continuously modify crops agricultural practices, which induce an increase production costs and environmental pollutants (Vásquez, 2008). Such problems had led to seek for alternatives for crop integrated management like: biological control, resistant varieties, transgenic plants and organic fertilizers among others (Zavaleta-Mejia *et al.*, 2003). In some alimentary important crops like potato; it has been studied new options to increase yield via oxidative and antioxidant response natural in plants, to be used and manipulated in integrated crop management (Mora-Herrera and López-Delgado, 2007; Romero-Romero and López-Delgado, 2009).

Stress increases the cell oxidative state, which induce an increase in enzymatic and non-enzymatic antioxidants synthesis to counters the effects of such oxidation. The main enzymatic antioxidants are: peroxidase (POX) catalase, superoxide dismutase (SOD), glutation S-transferase. The most important non enzymatic are: ascorbic acid (AA, vitamin C) α -tocoferol (vitamin E), glutation and β -carotenenes (Scandalios, 2005)

It has been reported that some compounds relate to the oxidative and antioxidant response originated by stress factors, like the ascorbic acid, are involved in the stress tolerance response to biotic and abiotic factors, as well as optimal development (Shen and Yen, 2010).

Ascorbic acid is present at chloroplasts, cytosol, vacuole and apoplasic space. The AA is perhaps the most important non enzymatic antioxidant in plants, and participates in the defense against biotic and abiotic oxidative stress because of its function reducing H_2O_2 throughout the glutation- ascorbat cycle (Smirnoff, 1996).

AA participates in many physiological processes such as: photosynthesis, enzymatic cofactors, homeostasis of the redox system, as a precursor of synthesis routes of molecule from the primary and secondary metabolism (Smirnoff, 1996) and a POX regulator (Sánchez *et al.*, 1997; Stasolla and Yeung, 2007). Besides, its involved on the growth, development and module of the cellular cycle and cellular division and elongation (De Pinto and De Gara, 2004). Evidence exist that exogenous AA applied to some crops promote growth, leading to higher yield (El-Tohany *et al.*, 2008); thus this is related to the increase in photosynthetic pigments like: in canola (Sakr and Arafa, 2009) potato (Romero-Romero and López-Delgado, 2009) and eggplant (Add-EIAziz *et al.*, 2006). At the same time it has been reported that AA (Add-EIAziz *et al.*, 2006) increases the resistance to stress and reduce the damage against biotic and abiotic stress (Shalata and Neumann, 2001; Athar *et al.*, 2008; Romero-Romero and López-Delgado, 2009).

2006). Asimismo, se ha reportado que el AA incrementa la resistencia a estrés y reduce el daño contra estrés biótico y abiótico (Shalata y Neumann, 2001; Athar *et al.*, 2008; Romero-Romero y López-Delgado, 2009).

Por otro lado, las POX participan en varias funciones fisiológicas de las plantas tales como: lignificación, entrecruzamiento de polisacáridos de la pared celular, oxidación del ácido indolacético, regulación de la elongación celular y oxidación de fenoles ligados al crecimiento (Yoshida *et al.*, 2003).

En la zona florícola del Estado de México, el cultivo del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.), especialmente el cultivar Polaris, es importante como flor de corte; se produce principalmente a campo abierto y en túnel (Benavides y Ramírez, 2003).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la molécula antioxidante AA como un compuesto alterno involucrado en las respuestas de desarrollo, específicamente en la respuesta fisiológica de: crecimiento, contenido de pigmentos fotosintéticos, proteína total y la actividad enzimática de las POX, para mejorar el rendimiento en el cultivo de crisantemo cultivar Polaris.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en un invernadero no tecnificado del Centro Universitario UAEM Tenancingo, ubicado en el km 1.5 de la Carretera Tenancingo-Villa Guerrero, Estado de México, cuyas coordenadas geográficas son: 18° 57' latitud norte y 99° 35' longitud oeste del meridiano de Greenwich, con altitud de 2,200 m.

Como material vegetativo se usaron esquejes con una altura promedio de 7 cm de *Dendranthema grandiflora* cultivar Polaris, adquiridos en la empresa PLANTAMAR en Santa Ana Ixtlahuatzingo, México, entre marzo y julio de 2008. Las plantas se desarrollaron a una temperatura promedio de 30 °C con una máxima de 50 °C y una mínima de 15 °C, humedad relativa promedio de 30-40 % y luminosidad promedio de 85 %.

Manejo del cultivo

Los esquejes se enraizaron aplicando en la base del tallo alfa naftil acetamida (1.2 g de i. a. \cdot kg⁻¹) y ácido indol-3-butírico (0.6 g de i. a. \cdot kg⁻¹), y se colocaron en charolas con tepojal por 15 días. Después se trasplantaron individualmente a macetas de 20 x 22 cm³; se usó como sustrato peat-moss y agrolita en una relación de 2:1. Las plantas se regaron dos veces por semana y se mantuvieron erguidas con tutores de madera sin desbotonar durante todo el ciclo. La fertilización se realizó dos veces durante el ciclo de cultivo con una solución de 100-50-200 mg \cdot L⁻¹ de N, P y K, para lo cual se utilizaron las sales de urea, fosfato monoamónico y nitrato de potasio.

Nevertheless, the POX take part in various physiological functions of plants like: lignification, polysaccharide intercross within the cell wall, indolacetic acid oxidation, regulation of cellular elongation and oxidation of phenols related to growth (Yoshida *et al.*, 2003).

In the flower production region sector of the State of Mexico, Mexico, chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.), particularly the Polaris cultivar, is important as a ornamental flower; it is mainly produced in open field and tunnels (Benavides and Ramírez, 2003).

The aim of the present study was to evaluate the effect of the AA, an alternative antioxidant molecule involved in the development response, specifically in the physiological response of: growth, photosynthetic pigments concentration, total protein, and the enzymatic activity of the POX for improving yield in the production of chrysanthemum of the Polaris cultivar.

MATERIAL AND METHODS

The present study was carried out at an un-technified greenhouse at the Centro Universitario UAEM Tenancingo, located at the 1.5 km of the Tenancingo-Villa Guerrero highway, State of México, with geographical coordinates 18° 57' latitude north and 99° 35' west longitude from the Greenwich meridian, 2,200 meters.

7cm mean high twigs for planting of *Dendranthema grandiflora* from the Polaris cultivar were used as vegetative material, these were produced by PLANTAMAR enterprises at Santa Ana Ixtlahuatzingo, Mexico, between March and July 2008. Plants developed under mean temperature of 30 °C with a maximum of 50 °C and minimum 15 °C, mean relative humidity of 30 – 40 % and a mean luminosity of 85 %.

Crop management

Twigs were rooted applying acetamin alpha naftil acetamin to each stem base (1.2 g of L. a. \cdot kg⁻¹) and indol-3butiric acid, and were placed in trays with fine volcanic sand for a 15 day period. After, they were transplanted individually to 20 x 22 cm³ plant pots; peat-moss and agrolite were used as substrate, on a 2:1 ratio. Plants were watered twice a week, and were maintained erect with a wooden stick during the hole cycle. Fertilization was made twice along the crop cycle with a solution of 100-50-200 mg \cdot L⁻¹ of N, P and K, for which the urea salts were used, monoamonic phosphate and potassium nitrate.

Ascorbic acid aspersions

Solution of AA (Reasol) were prepared: 24 hours before application at concentrations of 0, 3.4 and 6.8 mM pH 5.7: (oxidate AA), to which polysorbate 20 (tween) was added as a surfactant at 0.01 % (Romero-Romero and Lopez-Delgado, 2009). Solutions were sprayed at the leaf bundle (15 ml per plant) twice a week from 30 days after

Aspersiones de ácido ascórbico

Se prepararon soluciones de AA (Reasol) a las concentraciones de 0, 3.4 y 6.8 mM pH 5.7, 24 horas antes de la aplicación (AA oxidado), a las cuales se les agregó polisorbato 20 (Tween) como surfactante al 0.01 % (Romero-Romero y López-Delgado, 2009). Las soluciones se asperjaron sobre el haz de las hojas (15 ml por planta) dos veces por semana a partir de los 30 días de cultivo en invernadero y hasta los 100 días (cosecha). La aplicación se realizó con gota fina usando un aspersor manual (Venus-Pro) de 2 L de capacidad con boquilla de cono.

Las variables evaluadas fueron: proteína soluble, pigmentos fotosintéticos, actividad enzimática de POX, longitud, peso seco y número de tallos y de botones por planta en plantas de 100 días de cultivo. El experimento se realizó con 40 plantas por tratamiento.

Extracción de proteína

La extracción de proteína se realizó de acuerdo al método de Anderson *et al.* (1995). Se maceró un fragmento (100 mg) apical de hoja madura de la parte central del tallo principal. La proteína total se extrajo en una proporción de 1:4 ml con el amortiguador de fosfato de potasio (Baker; 50 mM, pH 7.2) conteniendo 5 mM de dithiothreitol (Sigma; DTT), 1 mM de ácido etilen diamino tetracético (Sigma; EDTA) y 2 % de polyvinyl pirrolidona (Baker; PVP). El extracto se centrifugó a 10,000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se usó para cuantificar proteína y actividad enzimática de la POX.

Proteína soluble

El contenido de proteína se determinó por el método de Bradford (1976). A 5 µl del sobrenadante se le agregaron 0.25 ml de reactivo de Bradford (Biorad) en un volumen final de 1.2 ml, y después de cinco minutos se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Hach Dr/4000U). La cuantificación de proteína se hizo tomando como referencia albúmina sérica de bovino como estándar.

Peroxidasa (EC 1.11.1.7)

La actividad enzimática de la POX se midió de acuerdo con el método descrito por Srivastava y Dwivedi (1998), en una mezcla de reacción con amortiguador de fosfato de sodio 50 mM pH 7.0, 3.33 mM de guaiacol, 4 mM de H₂O₂ y 0.020 ml del sobrenadante de la muestra en un volumen final de 3 ml. La reacción se inició con la adición del sobrenadante a 25-28 °C. Como blanco se utilizó amortiguador de reacción sin sobrenadante. La oxidación del sustrato (guaiacol) se midió por el incremento en la absorbancia a 470 nm durante tres minutos en intervalos de 30 segundos. Para determinar la actividad de la POX se usó el coeficiente de extinción del guaiacol $\epsilon = 2.6 \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$, en la ecuación $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} = (\epsilon) \cdot (\text{volumen final} / \text{volumen de la}$

after transferring in greenhouse up the 100 day (harvest). Application was made via fine drops with a manual spray (Venus Pro) with a 2 L capacity and a conic mouthpiece .

The evaluated variables were: soluble proteins, photosynthetic pigments, enzymatic activity of the POX, longitude, dry weight, stems number and blooms per plant on 100 days crop plants. Experiment was carried out on 40 plants for each treatment.

Protein extraction

Extraction was made following methods proposed by Anderson *et al.* (1995). An apical fragment of a mature leaf (100 mg) from the center of the main stem was macerated. Total protein was obtained in a 1:4 proportion with the potassium phosphate buffer (Baker; 50 mM, pH 7.2) which contained 5 mM of dithiothreitol (Sigma; DTT), 1 mM of ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma; EDTA) and – polyvinylpyrrolidone (Baker; PVP). The Extract was centrifuged at 10,000 g for a 10 minute period at 4 °C. The supernatant was used to quantify protein and POX enzymatic activity.

Soluble protein

Protein content was determined using the method proposed by Bradford (1976). To 5 µl of the supernatant 0.25 ml of the Bradford reactive were added, in a final volume of 1.2 ml, which after 5 minutes absorbance was measured at 595 nm in a spectrophotometer (Hach/Dr4000U). Protein quantification was carried out using bovine serum albumin as standard.

Peroxidase (EC 1.11.1.7)

The POX enzymatic activity was measured according to the methods proposed by Srivastava and Dwivedi (1998), in a reaction mixture with 50 mM of sodium phosphate buffer at pH 7.0, 3.33 mM guaiacol, 4 mM of H₂O₂ and 0.020 ml of the supernatant of the sample, on a final volume of 3 ml. The reaction was started with the addition of the supernatant at 25–28 °C. the buffer without supernatant was used as blanc . The substrate oxidation (guaiacol) was measured by the increase of the absorbance at 470 nm for a three minute period in 30 seconds intervals. To determine the POX activity the guaiacol extinction coefficient was used $\epsilon = 2.6 \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$, in the equation $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} = (\epsilon) \cdot (\text{final volume} / \text{sample volume}) \cdot (\text{mg of protein})$.

Photosynthetic pigments

The photosynthetic pigments quantification was carried out according to the methodology proposed by Lichtenthaler and Wellburn (1983). Fifty mg of leaf tissue (mature, from the middle of the main stem) were macerated in 2 ml of acetone 80 % (4 °C). Extract was centrifuged at 2,500 g for a 10 minute period, and the supernatant was recovered and adjusted to 2 ml. Absorbance was at 470 nm, 626 and 663. concentrations of chlorophyll a (Chl_a), chlorophyll b (Chl_b), xanthophylls and carotenoids (x + c) were calculated using the formulas:

muestra) (mg de proteína).

Pigmentos fotosintéticos

La cuantificación de los pigmentos fotosintéticos se hizo de acuerdo al método de Lichtenthaler y Wellburn (1983). Cincuenta mg de tejido de hoja (madura, tomada de la parte central del tallo principal) se maceraron en 2 ml de acetona al 80 % (4 °C). El extracto se centrifugó a 2,500 g durante 10 minutos y el sobrenadante se recuperó y ajustó a 2 ml. Se midió la absorbancia a 470, 646 y 663. Las concentraciones de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), xantofilas y carotenoides (x+c) se calcularon empleando las fórmulas:

$$\text{Chl}_a = 12.21 A_{663} - 2.81 A_{646}$$

$$\text{Chl}_b = 20.13 A_{646} - 5.03 A_{663}$$

$$C_{x+c} = (1000 A_{470} - 3.27 [\text{Chl}_a] - 107 [\text{Chl}_b]) / 229$$

Los resultados obtenidos se expresan en mg·g⁻¹ de peso fresco (PF)

El contenido de proteína, la actividad enzimática de la POX y los pigmentos fotosintéticos se midieron en tejido de hoja de 12 plantas por tratamiento.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 40 plantas en bloques de 10 por tratamiento. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$); el software utilizado fue StarGraphics plus versión 5.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tratamientos de AA en plantas de crisantemo cultivar Polaris incrementaron significativamente la longitud del tallo, peso seco, número de botones y tallos por planta con respecto al testigo; el mejor tratamiento fue la concentración de 6.8 mM de AA, debido a que incrementó la longitud en 17.5 %, el peso seco en 31 %, el número de botones en 48 % y el número de tallos en 31.8 % (Cuadro 1) con respecto al testigo. Estos resultados permiten inferir que el AA aplicado en plantas de crisantemo incrementa la biomasa, lo que en su momento lleva a un aumento en la productividad, que puede ser muy importante para incluir estos tratamientos en el sistema de manejo integrado de dicho cultivo.

Recientemente se encontró que la aplicación exógena de AA incrementó la productividad en plantas de gladiolo (Add-ElAziz *et al.*, 2009), en tubérculos de papa (Romero-Romero y López-Delgado, 2009), en canola (Sakr y Arafa, 2009), berenjena (El-Tohamy *et al.*, 2008), trigo (Athar *et al.*, 2008), haba (Younis *et al.*, 2009) y caoba (Add-ElAziz *et al.*, 2006); incluso el incremento de biomasa de estos cultivos se dio bajo condiciones de estrés biótico o abiótico. Imai *et al.* (1999) reportaron que la aplicación exógena de

$$\text{Chl}_a = 12.21 A_{663} - 2.81 A_{646}$$

$$\text{Chl}_b = 20.13 A_{646} - 5.03 A_{663}$$

$$C_{x+c} = (1000 A_{470} - 3.27 [\text{Chl}_a] - 107 [\text{Chl}_b]) / 229$$

The obtained results are expressed in mg·g⁻¹ of fresh weight (FW)

The protein content, enzymatic activity of the POX and the photosynthetic pigments were measured in leave tissue from 12 plants per treatment.

Experimental design and statistical analysis

A completely random experimental design was used with 40 plants in blocks of 10 plants per treatment. An analysis of variance (ANOVA) analysis and the Tukey mean comparison test ($P \leq 0.05$) were used; the used software was StarGraphics plus V 5.0

RESULTS AND DISCUSSION

AA treatments on chrisantemum plants cultivar Polaris significantly increased stem longitude, dry weight, blooms number and stem per plant respect to the witness; the best treatment was the 6.8 mM AA one, because it increased 17.5 %, dry weight 31 %, the number of blooms increased in 48 % and the stem number in 31.8 % (Figure 1) respect to its control. These results allow to infer that AA applied to chrisantemum increase the biomass, which in a given moment may lead to yield increase, which can be important in order to include this treatments in such crop management.

Recently, it has been found that AA exogenous application in Gladiolo plants (Add-ElAziz *et al.*, 2009), in potato potato tubers (Romero-Romero and López-Delgado, 2009) in canola (Sakr and Arafa, 2009), eggplant (El-Tohamy *et al.*, 2008), wheat (Athar *et al.*, 2008), faba bean (Younis *et al.*, 2009) and mahogany tree Add-ElAziz *et al.*, 2006); increase in the biomass of these crops was reported even when biotic or abiotic stress conditions. Imai *et al.* (1999) reported that exogenous application of AA may stimulate endogenous production of AA, which stimulate cellular growth by modifying the cell wall conditions and stimulate cellular division (De Pinto and De Gara, 2004; Smirnov, 1996). Biomass increase induced by AA observed in chrisantemum, may be related to its role in cellular division and elongation.

On other side, AA treatments in chrisantemum plants had a significant increase in the protein content (Figure 1) and photosynthetic pigments (Figure 2) as well as the POX enzymatic activity (Figure 3). Protein content increased 75 % in plants treated with 3.4 and 6.8 mM of AA, respect to its control; even when the highest AA concentration (6.8 mM) induced an increase in the chlorophyll *a* and carotenoid concentrations.

The increase in protein and photosynthetic pigments included in the AA applications; is related to biomass accu-

AA puede estimular la producción endógena de AA, lo que estimula el crecimiento celular al modificar las condiciones de la pared celular y estimular la división celular (De Pinto y De Gara, 2004; Smirnov, 1996). El incremento de biomasa inducido por AA observado en el cultivo de crisantemo, puede estar relacionado a su participación en la división de la célula y alargamiento celular.

CUADRO 1. Efecto del ácido ascórbico (AA) en la longitud, peso seco y número de botones y tallos en plantas de crisantemo cultivar Polaris, a los 100 días después del trasplante.

TABLE 1. Effect of ascorbic acid (AA) in longitude, dry weight, bloom number and stem number in chrysanth plants Polaris cultivar, 100 days after transplant.

Tratamiento				
Ácido ascórbico (AA) [mM]	Longitud (cm)	Peso seco (g)	Núm. de botones por planta	Núm. de tallos por planta
0	45.3 ± 1.5b	6.6 ± 0.37c	5.6 ± 0.26c	2.2 ± 0.19b
3.4	52.3 ± 2.6a	7.8 ± 0.39b	7.0 ± 0.36b	2.3 ± 0.20b
6.8	53.2 ± 3.0a	8.7 ± 0.29a	8.3 ± 0.40a	2.9 ± 0.068a

Los resultados son el promedio de 40 plantas ± error estándar, valores con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

The results are the average of 40 plants ± standard error; values with the same letter are equal according to the Tukey's test at $P \leq 0.05$.

Por otro lado, los tratamientos de AA en las plantas de crisantemo incrementaron significativamente el contenido de proteína (Figura 1) y pigmentos fotosintéticos (Figura 2) así como la actividad enzimática de la POX (Figura 3). El contenido de proteína incrementó 36 % en las plantas asperjadas con AA a la concentración de 6.8 mM con respecto al testigo, y el contenido de pigmentos aumentó en un 75 % en las plantas tratadas con 3.4 y 6.8 mM de AA con respecto al testigo; aunque la concentración más alta de AA (6.8 mM) indujo un incremento mayor en el contenido de clorofila *a* y de los carotenoides.

El incremento de proteínas y pigmentos fotosintéticos inducido por las aplicaciones de AA, se relaciona con la acumulación de biomasa observada en las plantas de crisantemo evaluada en este trabajo como longitud, peso seco y número de botones y tallos por planta; respuesta que se ha reportado en otros cultivos como: papa (Romero-Romero y López-Delgado, 2009), caoba (Add-EIAziz *et al.*, 2006), gladiola (Add-EIAziz *et al.*, 2009) y canola (Dolatabadian *et al.*, 2008; Sakr y Arafa, 2009). Además, Athar *et al.* (2008) reportan que se requiere de una alta capacidad fotosintética para el crecimiento, y esto está ligado a la inducción de las rutas metabólicas en las cuales es necesario el incremento de la síntesis de proteínas en las cuales el AA participa (De Pinto y De Gara, 2004).

Es importante enfatizar que el incremento de pigmentos fotosintéticos inducido por AA en varios cultivos inclusive está relacionado con la protección contra estrés, porque algunos pigmentos fotosintéticos

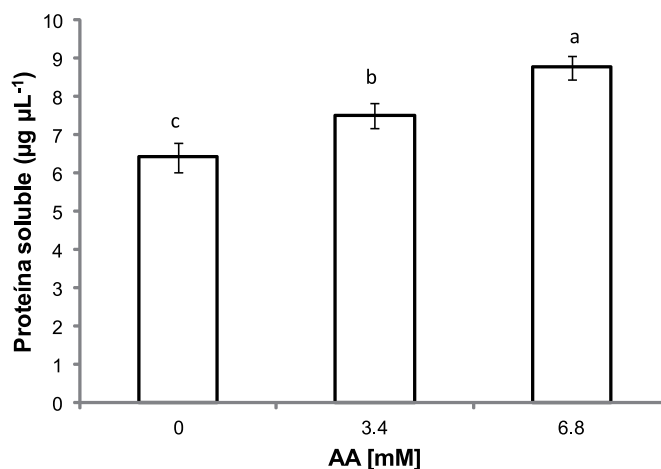


FIGURA 1. Efecto de ácido ascórbico (AA) en el contenido de proteína de crisantemo cultivar Polaris, a los 100 días después del trasplante. Valores con la misma letra, son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

FIGURE 1. Ascorbic acid (AA) effect in the protein content in chrysanth plants from the Polaris cultivar, 100 days after transplant. Values with the same letter are equal according to the Tukey test to a $P \leq 0.05$.

mulation in chrysanth

Evaluated here, like longitude, dry and wet weight, button number and stems per plant; such response has been reported for other crops like: potato (Romero-Romero and López-Delgado, 2009) in mahogany tree (Add-EIAziz *et al.*, 2006), gladiolus (Add-EIAziz *et al.*, 2009) and canola (Dolatabadian *et al.*, 2008; Sakr and Arafa, 2009). In addition Athar *et al.* (2008) reports that a high photosynthetic capacity is required for growth, and is connected to the induction of metabolic routes in which it is necessary the increase of protein synthesis, in which AA takes part off (De Pinto and De Gara, 2004).

It is notable that the increase in photosynthetic pigments induced by AA applications in various crops is even related with the stress protection, because some photosynthetic pigments like carotenoids have an antioxidant function (Khan *et al.*, 2006; Dolatabadian *et al.*, 2008, 2009; Sark and Arafa, 2009; Romero-Romero and López-Delgado, 2009; Dolatabadian and Jouneghani, 2009), making this compound potentially useful not only for increasing biomass, but as possible tolerance inductor for chrysanthemum stress factors, as positive effects has been observed even in plants positive for the TSWV virus (unpublished results).

Regarding the enzymatic activity of the POX, this increased 33 % in the treated plants with 3.4 and 22 % with 6.8 mM of AA, respect to its control. Such response is contrary to the available literature. It has been found that in wheat (Khan *et al.*, 2006; Athar *et al.*, 2008), bean (Dolatabadian and Jouneghani, 2009) and canola (Dolatabadian *et al.*, 2008) AA application does not modify the POX enzymatic

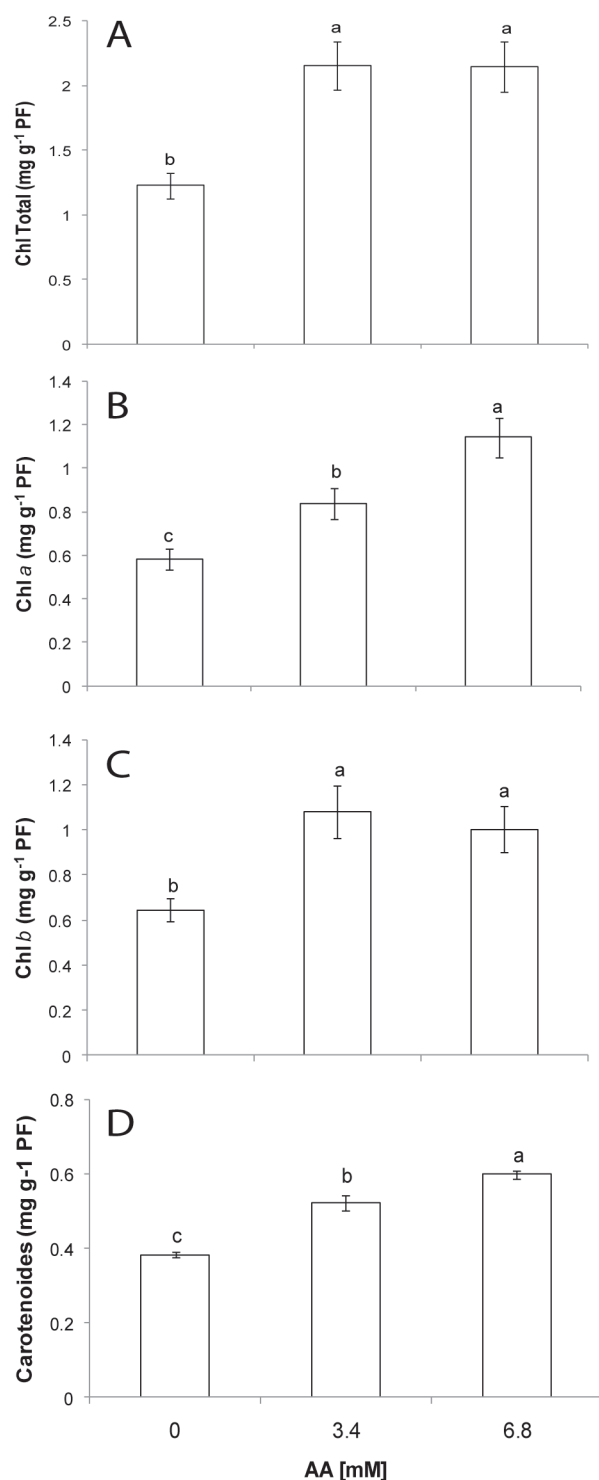


FIGURA 2. Efecto de ácido ascórbico (AA) en los pigmentos fotosintéticos: A) clorofila total, B) Clorofila a, C) Clorofila b y D) Carotenoides de crisantemo cultivar Polaris, a los 100 días después del trasplante. Valores con la misma letra, son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

FIGURE 2. Ascorbic acid (AA) effect in photosynthetic pigments: A) total chlorophyll a, C) chlorophyll b and, D) Carotenoids form *Chrysanthemum Polaris* cultivar 100 days after transplant. Values with the same letter are equal according to the Tukey test to a $P \leq 0.05$.

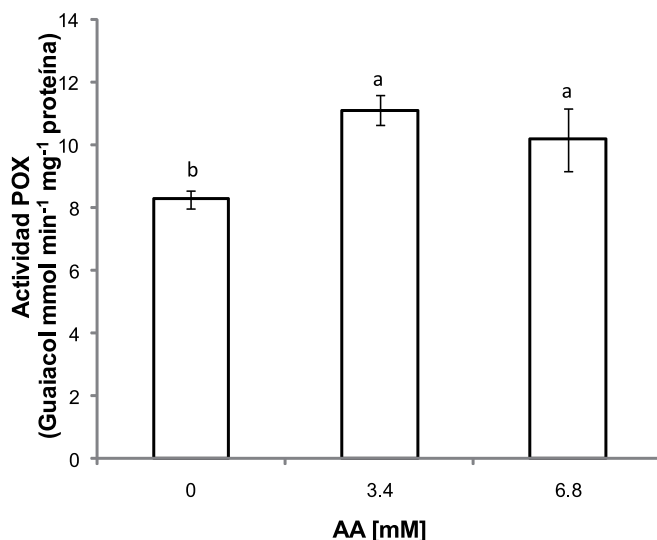


FIGURA 3. Efecto de ácido ascórbico (AA) en la actividad enzimática de las peroxidasas (POX) de crisantemo cultivar Polaris, a los 100 días después del trasplante. Valores con la misma letra, son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

FIGURE 3. Ascorbic acid (AA) effect in enzymatic activity in peroxidases (POX) of *chrysanthemum Polaris* cultivar 100 days after transplant. Values with the same letter are equal according to the Tukey test to a $P \leq 0.05$.

tic activity, but does affect other antioxidant enzymes (Athar *et al.*, 2008). In saline stress conditions, even POX activity levels decrease (Do-latabadian *et al.*, 2008; 2009), at the same time in *Vicia faba* are increased (Younis *et al.*, 2009). According to these researches and the results presented in the present study, the POX activity will depend upon the concentration, application technique, application number, crop, and phenologyc stage, among other factors. Induced growth in chrysanth plants by applying AA is probably due the fact that it participate in some metabolic function related to cell wall wrought and development (Stasolla and Yeung, 2007), as was found in pine hypocotyls, were AA intervenes in the formation of dehydrodi-ferulic bridges and polysaccharides catalyzed by the POX during cellular growth.

CONCLUSIONS

Ascorbic acid is potentially useful to increase biomass in *chrysanthemum Polaris* cultivar, as an alternative directed to yield increase.

The AA may be included in crop management, because its low environmental and economical costs.

ACKNOWLEDGMENTS

To the financial support provided by the Universidad Autónoma del Estado de México UAEM, 2525/2007U Project.

End of English Version

como los carotenoides tienen función antioxidante (Khan *et al.*, 2006; Dolatabadian *et al.*, 2008; 2009; Sark y Arafa, 2009; Romero-Romero y López-Delgado, 2009; Dolatabadian y Jouneghani, 2009), lo que hace a este compuesto potencialmente útil no sólo para el incremento de biomasa, sino también como posible inductor de tolerancia a factores de estrés en el cultivo de crisantemo, ya que se han observado efectos benéficos aun en plantas positivas al virus TSWV (datos no publicados).

Con respecto a la actividad enzimática de la POX, ésta aumentó 33 % en las plantas tratadas con 3.4 y 22 % con 6.8 mM de AA, con respecto al testigo. Esta respuesta es diferente a lo reportado en la literatura. Se ha encontrado que en trigo (Khan *et al.*, 2006; Athar *et al.*, 2008), frijol (Dolatabadian y Jouneghani, 2009) y canola (Dolatabadian *et al.*, 2008) la aplicación de AA no modifica la actividad enzimática de la POX, pero afecta otras enzimas antioxidantes (Athar *et al.*, 2008). En condiciones de estrés salino, inclusive baja los niveles de actividad de la POX (Dolatabadian *et al.*, 2008; 2009) mientras que en *Vicia faba* los incrementa (Younis *et al.*, 2009). De acuerdo a estas investigaciones y a los resultados obtenidos en este trabajo, la actividad enzimática de la POX va a depender de la concentración, forma de aplicación, número de aplicaciones, tipo de cultivo y etapa fenológica, entre otros factores. La inducción del crecimiento en las plantas de crisantemo por el AA probablemente se deba a que éste participe en alguna función metabólica relacionada con el crecimiento o desarrollo de la pared celular (Stasolla y Yeung, 2007), como se encontró en hipocótilos de pino, donde el AA interviene en la formación de los puentes de dehidrodiferulico y los polisacáridos catalizados por las POX durante el crecimiento celular (Sánchez *et al.*, 1997).

CONCLUSIONES

El AA es un compuesto potencialmente útil para incrementar la biomasa en el cultivo de crisantemo cultivar Polaris, como una alternativa que puede ser encaminada a la productividad.

El AA es un compuesto que puede incluirse en el manejo integrado de los cultivos, por ser un compuesto económico e inocuo al ambiente.

AGRADECIMIENTOS

Al financiamiento otorgado por la Universidad Autónoma del Estado de México UAEM, proyecto 2525/2007U.

LITERATURA CITADA

- ADD-EIAZIZ, N. G. A.; MAZHER, M. A. A., EL-HABBA, E. 2006. Effect of foliar spraying with ascorbic acid on growth and chemical constituents of *Khaya senegalensis* grown under salt condition. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science 1(3): 207-214.
- ADD-ELAZIZ, N. G.; TAHA LOBNA, S.; SOAD, M. M. I. 2009. Some studies on the effect of putrescine, ascorbic acid and thiamine on growth, flowering and some chemical constituents of gladiolus plant at nubaria. Ozean Journal of Applied Sciences 2(2): 169-179.
- ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. Plant Physiology 109: 1247-1257.
- ATHAR, H. R.; KHAN, A.; ASHRAF, M. 2008. Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. Environmental and Experimental Botany 63: 224-231.
- BENAVIDES, A.; RAMIREZ, H. 2003. Horticultural science and industry in Mexico overview, Chronica Horticulturae 43: 20-25.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72(1-2): 248-254.
- DE PINTO, M. C.; DE GARA, L. 2004. Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. Journal of Experimental Botany 55(408): 2559-2569.
- DOLATABADIAN, A.; JOUNEGHANI, R. S. 2009. Impact of exogenous ascorbic acid on antioxidant activity and some physiological traits of common bean subjected to salinity stress. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 37(2): 165-172.
- DOLATABADIAN, A.; SANAVY, S. A. M. M.; CHASHMI, N. A. 2008. The effects of foliar application of ascorbic acid (vitamin C) on antioxidant enzymes activities, lipid peroxidation and proline accumulation of canola (*Brassica napus* L.) under conditions of salt stress. Journal of Agronomy and Crop Science 194: 206-213.
- DOLATABADIAN, A.; SANAVY, S. A. M. M.; SHARIFI, M. 2009. Alleviation of water deficit stress effects by foliar application of ascorbic acid on *Zea mays* L. Journal of Agronomy and Crop Science 195: 347-355.
- EL-TOHAMY, W. A.; EL-ABAGY, H. M.; EL-GREADLY, N. H. M. 2008. Studies on the effect of putrescine, yeast and vitamin C on growth, yield and physiological responses of eggplant (*Solanum melongena* L.) under sandy soil conditions. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 2(2): 296-300.
- IMAI, T.; KINGSTON-SMITH, A. H.; FOYER, C. H. 1999. Ascorbate metabolism in potato leaves supplied with exogenous ascorbate. Free Radical Research 31: S171-S179.
- KHAN, A.; AHMAD, M. S. A.; ATHAR, H-R.; ASHRAF, M. 2006. Interactive effect of foliarly applied ascorbic acid and salt stress on wheat (*Triticum aestivum* L.) at the seedling stage. Pakistan Journal of Botany 38(5): 1407-1414.
- LICHTENTHALER, H. K.; WELLBURN, A. R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts

- in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591-592.
- MORA-HERRERA, M. E.; LÓPEZ-DELGADO, H. A. 2007. Freezing tolerance and antioxidant activity in potato microplants induced by abscisic acid treatment. *American Journal of Potato Research* 84: 487-495.
- ROMERO-ROMERO, M. T.; LÓPEZ-DELGADO, H. A. 2009. Ameliorative effects of hydrogen peroxide, ascorbate and dehydroascorbate in *Solanum Tuberosum* Infected by phytoplasma. *American Journal of Potato Research* 86: 218-226.
- SAKR, M. T.; ARAFA, A. A. 2009. Effect of some antioxidants on canola plants grown under soil salt stress condition. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 12 (7): 582-588.
- SÁNCHEZ, M.; QUEIJEIRO, E.; REVILLA, G.; ZARRA, I. 1997. Changes in ascorbic acid levels in apoplastic fluid during growth of pine hypocotyls. Effects on peroxidase activities associated with cell walls. *Physiologia Plantarum* 101: 815-820.
- SCANDALIOS, J. G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 995-1014.
- SHALATA, A.; NEUMANN, P. M. 2001. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany* 52(364): 2207-2211.
- SHEN, C-H.; YEH, K-W. 2010. The signal network of ascorbate homeostasis. *Plant Signaling and Behavior* 5(5): 570-572.
- SMIRNOFF, N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* 78: 661-669.
- SRIVASTAVA, M. K.; DWIVEDI, U. N. 1998. Salicylic acid modulates glutathione metabolism in pea seedlings. *Journal of Plant physiology* 153(3-4): 409-414.
- STASOLLA, C.; YEUNG, E. C. 2007. Cellular ascorbic acid regulates the activity of mayor peroxidases in the apical poles of germinating white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 188-198.
- VÁSQUEZ, Y. 2008. Impacto en la salud asociado al uso de agroquímicos en la comunidad de Santa Ana Ixtlahuatzingo, municipio de Tenancingo, Estado de México. *Boletín Informativo de Geografía de la Salud* Núm. 6.
- YOSHIDA, K.; KAOTHIEEN, P.; MATSUI, T.; KAWAOKA, A. 2003. Molecular biology and application of plant peroxidase genes. *Applied microbiology and Biotechnology* 60(6): 665-670
- YOUNIS, M. E.; HASANEEN, M. N. A.; KAZAMENT, A. M. S. 2009. Exogenously applied ascorbic acid ameliorates detrimental effects of NaCl and mannitol stress in *Vicia faba* seedlings. *Protoplasma* 239(1-14): 39-48.
- ZAVALETA-MEJÍA, E.; ROJAS, M. R. I.; OCHOA, M. D. L. 2003. Manejo Ecológico de Enfermedades. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 114 p.