

APPLICATION OF LOW CONCENTRATIONS OF SALICYLIC ACID INCREASES THE NUMBER OF FLOWERS IN *Petunia hybrida*

BAJAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO SALICÍLICO INCREMENTA EL NÚMERO DE FLORES EN *Petunia hybrida*

Rodolfo Martín-Mex, Silvia Vergara-Yoisura, Angel Nexticapán-Garcés, Alfonso Larqué-Saavedra

Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. Calle 43 No. 130, Chuburná de Hidalgo, 97200, Mérida, Yucatán, México. (larque@cicy.mx)

ABSTRACT

The effect of applications of low concentrations of salicylic acid (SA) on the number of flowers and the date of flower initiation in *Petunia (Petunia hybrida)* is reported in this paper. Concentrations of 1 μ M to 1pM of SA were spread on three occasions to the shoot of plantlets cultivated in greenhouse conditions. Analysis of the results showed that all the concentrations of SA tested increased the number of open flowers per plant. Concentrations as low as 1pM or 0.1nM induced positive responses by 33 % and 37 %, as compared with that of the control. The highest concentration of 1 μ M increased not only the number of flowers by 72 % but also induced early flowering by six days.

Key words: flowering, low concentrations, petunia, salicylic acid.

INTRODUCTION

Since 1975, it was reported that applications of salicylates induce physiological responses in plants, such as stomata closure (Larqué-Saavedra and Martín-Mex, 2007). Further work demonstrated that salicylic acid (SA) should be considered as a growth regulator (Raskin, 1992). Among other plant responses, SA has been reported to affect various physiological processes such as photosynthesis, plant growth, nitrate metabolism, ethylene production, mineral nutrients, heat production (Hayat *et al.* 2007); increase the biomass of soya (*Glycine max*) and pine (*Pinus patula*) (Gutiérrez *et al.* 1998; San Miguel *et al.* 2003); increase, the somatic embryogenesis in tissue cultures (Luo *et al.* 2001; Quiroz-Figueroa

RESUMEN

Se reporta el efecto de aplicaciones de bajas concentraciones de ácido salicílico (AS) en el número de flores y la fecha del inicio de floración en *petunia (Petunia hybrida)*. Se asperjaron concentraciones de 1 μ M a 1pM de AS en tres ocasiones, a plántulas cultivadas en condiciones de invernadero. Los análisis de los resultados mostraron que todas las concentraciones probadas de AS incrementaron el número de flores abiertas por planta. Concentraciones tan bajas como de 1pM ó 0.1nM indujeron respuestas positivas en 33 % y 37 %, en comparación con el testigo. La concentración más alta, de 1 μ M, aumentó no sólo el número de flores en 72 %, sino también indujo la floración seis días antes.

Palabras clave: floración, bajas concentraciones, petunia, ácido salicílico.

INTRODUCCIÓN

Desde 1975 se reportó que las aplicaciones de salicilatos inducen respuestas fisiológicas en plantas, como el cierre de estomas (Larqué-Saavedra y Martín-Mex, 2007). Investigaciones posteriores demostraron que el ácido salicílico (AS) debe ser considerado un regulador del crecimiento (Raskin, 1992). Entre otras respuestas en las plantas, se ha reportado que el AS afecta diversos procesos fisiológicos como la fotosíntesis, el crecimiento vegetal, el metabolismo del nitrato, la producción de etileno, la nutrición mineral, y la producción de calor (Hayat *et al.*, 2007); aumenta la biomasa de la soya (*Glycine max*) y el pino (*Pinus patula*) (Gutiérrez *et al.*, 1998; San Miguel *et al.*, 2003); aumenta la embriogénesis somática en cultivos de tejidos (Luo *et al.*, 2001; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2001); induce la tolerancia al estrés abiótico en plantas de papa (*Solanum tuberosum*), frijol y jitomate (*Lycopersicon esculentum*)

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: October, 2009. Approved: June, 2010.

Published as NOTE in *Agrociencia* 44: 773-778. 2010.

et al. 2001); induction of abiotic stress tolerance in potato (*Solanum tuberosum*), bean and tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants (López-Delgado *et al.* 2004; Senaratna *et al.* 2000); and UV protection (Mahdavian *et al.* 2008). Besides, it is important in the activation of stress defense genes and in oxidative and calcium signaling (Holuigue *et al.* 2007; Kawano and Furuichi, 2007). High levels of endogenous SA have been identified as an important factor in the acquired systemic resistance (ASR) in several species (Shah, 2003).

Agronomists and ecologists know that stress conditions induce early flowering in certain species of plants described as avoiders. Stress stimulates the accumulation of fitohormones such as abscisic acid, ethylene and other metabolites such as salicylic acid that have been involved in the flowering process (Larqué-Saavedra and Wain, 1974; Raskin, 1992). Martinez *et al.* (2003) in *Arabidopsis* have began to explain at the molecular level how UV-C light stress activates via SA the flowering in *Arabidopsis thaliana*.

The effect of application of SA in flowering was reported by Cleland and Tanaka (1979) who found that this hormone could substitute the photoperiod stimulus in *Lemma gibba*, a long day plant. This finding was considered important in our line of research on salicylates. In a previous works it was found that African violet (*Saintpaulia ionantha*) a long-day plant treated with 0.1nM of SA increased the number of flowers by 75 % (Martin-Mex *et al.*, 2005). The present report was carried out to test the hypothesis that application of low concentrations of SA affects the flowering of the long day ornamental plant petunia (*Petunia hybrida*).

MATERIALS AND METHODS

Seeds of Petunia plants (*Petunia hybrida*) cv “Madness White” (Ball Seed, Inc.) were sown into plug-trays (volume of each cell 40 mL) containing peat moss. These were watered and held for seed germination. At emergence, uniform seedlings were transferred and cultivated in 370 mL pots, under greenhouse conditions with average day and night temperatures of 30 °C and 19 °C, and under natural conditions of light (800 mmol m⁻² s⁻¹) with a 11/13 h day/ night photoperiod. A mixture of soil was used as a substrate (Sunshine Mix # 1°, Sun Gro Horticulture, Bellevue, Wash. and Redi earth °Scotts-Sierra Horticultural Products Company). The plants were kept in well water conditions and fertilized weekly via the irrigation system

(López-Delgado *et al.*, 2004; Senaratna *et al.*, 2000); y da protección de los UV (Mahdavian *et al.*, 2008). Además, es importante en la activación de genes de defensa contra el estrés y en la señalización oxidativa y de calcio (Holuigue *et al.*, 2007; Kawano y Furuichi, 2007). Se ha identificado que altos niveles de AS endógeno son un factor importante en la resistencia sistémica adquirida (RSA) en varias especies (Shah, 2003).

Agrónomos y ecólogos saben que las condiciones de estrés inducen la floración temprana en ciertas especies de plantas descritas como evasoras. El estrés estimula la acumulación de fitohormonas como el ácido abscísico, el etileno y otros metabolitos como el ácido salicílico, que están involucrados en el proceso de floración (Larqué-Saavedra y Wain, 1974; Raskin, 1992). Martinez *et al.* (2003), con *Arabidopsis*, comenzaron a explicar a nivel molecular cómo el estrés por luz UV-C activa la floración vía el AS en *Arabidopsis thaliana*.

El efecto de la aplicación de AS en la floración fue reportado por Cleland y Tanaka (1979), quienes encontraron que esta hormona podría sustituir el estímulo del fotoperiodo en *Lemma gibba*, una planta de día largo. Este hallazgo fue considerado importante en nuestra línea de investigación con salicilatos. En investigaciones anteriores, se encontró que en violeta africana (*Saintpaulia ionantha*), una planta de día largo tratada con 0.1 nM de AS aumentó el número de flores en 75 % (Martin-Mex *et al.*, 2005). El presente estudio se llevó a cabo para probar la hipótesis de que la aplicación de bajas concentraciones de AS afecta la floración de petunia (*Petunia hybrida*) una planta ornamental de día largo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se sembraron semillas de petunia (*Petunia hybrida*) cv “Madness White” (Ball Seed, Inc.) en charolas de siembra (con un volumen de 40 mL en cada celda) que contenían *Sphagnum*. Estas se regaron y conservaron hasta la germinación de las semillas. Después de la emergencia, plántulas uniformes se transplantaron y cultivaron en macetas de 370 ml, en condiciones de invernadero con temperaturas promedio de día y de noche de 30 °C y 19 °C, y en condiciones naturales de luz (800 mmol m⁻² s⁻¹) con un fotoperiodo de 11/13 h día/noche. Se utilizó una mezcla de suelo como substrato (Sunshine Mix #1°, Sun Gro Horticulture, Bellevue, Wash. y Rediearth° Scotts-Sierra Horticultural Products Company). Las plantas se mantuvieron en buenas condiciones

with 130 mg L⁻¹ of nitrogen, phosphorous and potassium (Haifa Chemicals Ltd.). The experiment was carried out at the Scientific Research Center of Yucatán in Mérida, México, from August to December, following the regular cultural techniques and methods for ornamental plants.

The salicylic acid solutions (Merck, Co.) were applied as treatments at concentrations of 1.0, 0.01, 0.0001 and 0.000001 μ M, and water as a control. Tween-20 was added to the solution as surfactant. All treatments were sprayed simultaneously to the shoot of plants until runoff at 6 a.m. The applications were carried out at 27, 34 and 41 d of plant age. The initiation of flowering was evaluated over the subsequent 18 weeks after the first applications of the solution by counting the number of fully open flowers (corolla fully open) exposed.

The experimental design was completely randomized with five replicates per treatment. Data from the experiment were analyzed with ANOVA (Tukey, $p \leq 0.05$) using SAS (2003).

RESULTS AND DISCUSSION

Results showed that applications of salicylic acid (SA) have a significant effect on the number of flowers per plant at the concentrations evaluated (Figure 1). The curve pattern registered indicates that the best treatment was 1 μ M which increased the number of flowers by 72 %, in comparison with that of the control, while the treatments of 0.01 μ M, 0.1nM, and 1pM SA did by 58 %, 37 % and 33 %. Flowering initiated the third week after the first spraying and by the fifth week, the treatment of 1 μ M SA presented 20 flowers per plant, while the control had only 9 (Figure 2).

The data of this experiment confirm that applications of low concentrations of SA to the shoot of seedlings affect the flowering of ornamental plants. However the sensitivity of plants to SA concentrations when compared with data recorded on similar experiments with two other ornamental plants is different. African violet required only 0.1nM to increase the number of flowers per plant, gloxinia 0.01 μ M of SA and *Petunia* 1 μ M of SA. It must be said, however, that in the three species studied SA induce early flowering (Martin-Mex *et al.*, 2005).

The results of the present experiment agree with our previous reports that there is a great sensitivity of plant tissues to applications of low concentrations of SA. Transformed roots as well as somatic embryogenesis bioassay systems and the data of the

de humedad y se fertilizaron semanalmente a través del sistema de irrigación con 130 mg L⁻¹ de nitrógeno, fósforo y potasio (Haifa Chemicals Ltd.). El experimento se realizó en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, en Mérida, México, de agosto a diciembre, siguiendo técnicas y métodos normales de cultivo para plantas ornamentales.

Las soluciones de ácido salicílico (Merck, Co.) se aplicaron como tratamientos a concentraciones de 1.0, 0.01, 0.0001 y 0.000001 μ M, y se usó agua como testigo. Se añadió Tween-20 a la solución como tensoactivo. Todos los tratamientos se asperjaron simultáneamente a las plántulas hasta escurrir, a las 6 a.m. Las aplicaciones se realizaron a los 27, 34 y 41 días de edad de las plantas. El inicio de la floración se evaluó a lo largo de las 18 semanas después de la primera aplicación de la solución, al contar el número de flores abiertas (corola completamente abierta) expuestas.

El diseño experimental fue completamente aleatorio con cinco réplicas por tratamiento. Los datos del experimento se analizan con ANDEVA (Tukey, $p \leq 0.05$), usando SAS (2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que las aplicaciones de ácido salicílico (AS) tienen un efecto significativo en el número de flores por planta a las concentraciones

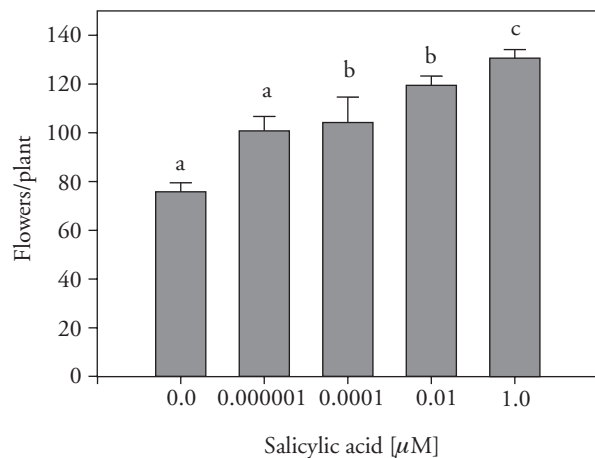


Figure 1. The effect of low concentration of salicylic acid (SA) on the number of open flowers in petunia (*Petunia hybrida*). Each point is the mean of five plants \pm standard error. Bars with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

Figura 1. El efecto de bajas concentraciones de ácido salicílico (AS) en el número de flores abiertas de petunia (*Petunia hybrida*). Cada punto es el promedio de cinco plantas \pm error estándar. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

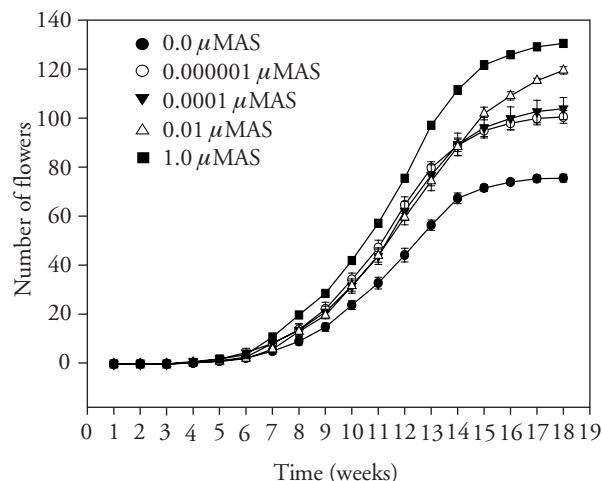


Figure 2. The effect of different concentrations of salicylic acid (SA) on the dynamics of flowers exposed in petunia (*Petunia hybrida*) plants grown in greenhouse conditions. Each point is the average of five plants \pm standard error.

Figura 2. El efecto de diferentes concentraciones de ácido salicílico (AS) en la dinámica de exposición de flores en plantas de petunia (*Petunia hybrida*) cultivadas en condiciones de invernadero. Cada punto es el promedio de cinco plantas \pm error estándar.

present report suggest that it might be a complex mechanism of action of SA to explain such responses (Quiroz-Figueroa *et al.* 2001; Martin-Mex *et al.*, 2005; Echevarria-Machado *et al.* 2007).

The results of the present report with petunia, a long day plant, correlate with the work reported by Cleland and Tanaka (1979) with *Lemna gibba*, where application of SA overcome the demand of photoperiod to flower. Photoperiods as well as thermo period have been described as critical for the expression of genes in the flowering process. The data of the present report might be linked to the seasonal flowering locus (SFL), a regulatory molecular mechanism that switches photoperiod and thermo period to flowering (Mouhu *et al.* 2009).

Martinez *et al.* (2003) report that stress activates flowering in *Arabidopsis thaliana* via SA. Using a SA deficient mutant they show the importance of this molecule, that seems to induce flowering without the activations of well known genes, reported in the process such as *CONSTANTS* (CO) or *FLOWERING LOCUS* (FC). The present report could be linked with the proposal of these authors in the sense that SA induces flowering, following a novel and independent metabolic way. Besides, the use of SA

evaluadas (Figura 1). La curva patrón indica que el mejor tratamiento fue el de 1 μ M, el cual incrementó el número de flores en 72 %, comparado con el testigo, mientras que los tratamientos de 0.01 μ M, 0.1 nM y 1 pM de AS lo hicieron en 58 %, 37 % y 33 %. La floración inició la tercera semana después de la primera aspersión y para la quinta semana, el tratamiento de 1 μ M de AS presentó 20 flores por planta, mientras que el testigo tenía sólo 9 (Figura 2).

Los datos de este experimento confirman que aplicaciones de bajas concentraciones de AS a plántulas afectan la floración de plantas ornamentales. Sin embargo, la sensibilidad de las plantas a las concentraciones de AS, cuando se compara con datos registrados en experimentos similares realizados con otras plantas ornamentales, es diferente. La violeta africana requirió únicamente 0.1 nM para incrementar el número de flores por planta, gloxinia 0.01 μ M de AS y petunia, 1 μ M de AS. Debe mencionarse, no obstante, que en las tres especies estudiadas, el AS indujo la floración temprana (Martin-Mex *et al.*, 2005).

Los resultados del experimento aquí presentado concuerdan con nuestros reportes previos de que existe una gran sensibilidad de los tejidos vegetales a las aplicaciones de bajas concentraciones de AS. Raíces transformadas, así como sistemas de bioensayo de embriogénesis somática, y los datos de este reporte, sugieren que es un mecanismo de acción complejo del AS para poder explicar estas respuestas (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2001; Martin-Mex *et al.*, 2005; Echevarria-Machado *et al.*, 2007).

Los resultados del presente reporte con petunia, una planta de día largo, se correlacionan con el trabajo reportado por Cleland y Tanaka (1979) con *Lemna gibba*, donde la aplicación de AS sustituye la demanda de fotoperiodo para la floración. Los fotoperiodos, así como el termo periodo, han sido descritos como críticos para la expresión de genes en el proceso de floración. Los datos del presente trabajo pueden estar vinculados con el locus de floración estacional (LFE), que a nivel molecular regula el fotoperiodo y el termo periodo con la floración (Mouhu *et al.*, 2009).

Martinez *et al.* (2003) reportan que el estrés activa la floración en *Arabidopsis thaliana* vía el AS. Usando un mutante deficiente en AS, ellos demuestran la importancia de esta molécula, que parece inducir la floración sin la activación de genes ya reportados para este proceso, como son los llamados *CONSTANTES* (CO) o *LOCUS DE FLORACIÓN* (CF). El presente

might be a new tool for the molecular biologists as to elucidate the genes and mechanisms that regulate flowering, since this process is not fully understood.

The findings of the present report might be of importance for practical use in ornamental horticulture.

CONCLUSIONS

A dose response curve to estimate the effect of low concentrations of SA in the number of flowers in petunia plants was established. SA at 1 μ M increases up to 72 % the number of flowers per plant in comparison with the control. SA induced earliness in the flowering of petunia by six days.

ACKNOWLEDGEMENTS

To CONACYT Grant No. 33647-B; to E. Balám Uc and G. Briceño for their technical support.

LITERATURE CITED

- Cleland, C. F., and O. Tanaka. 1979. Effect of day length on the ability of salicylic acid to induce flowering in the long-day plant *Lemna gibba* G3 and the short-day plant *Lemna paucicostata* 6746. *Plant Physiol.* 64: 421-424.
- Echeverría-Machado I., R. M. Escobedo-G.M., and A. Larqué-Saavedra. 2007. Responses of transformed *Catharanthus roseus* roots to femtomolar concentrations of salicylic acid. *Plant Physiol. Biochem.* 45:501-507.
- Gutiérrez C., M., L.C. Trejo, and A. Larqué-Saavedra. 1998. Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 36:(8) 563-565.
- Hayat, S., B. Ali, and A. Ahmad. 2007. Salicylic acid: Biosynthesis, metabolism and physiological role in plants (Chapter 1). *In: Hayat, S., and A. Ahmad (eds). Salicylic Acid-A Plant Hormone.* Springer, Dordrecht. The Netherlands. pp: 1-14.
- Holuigüe, L., P. Salinas, F. Blanco, and V. Garretón. 2007. Salicylic acid and reactive oxygen species in the activation of stress defense genes (Chapter 8). *In: Hayat, S., and A. Ahmad (eds). Salicylic Acid-A Plant Hormone.* Springer, Dordrecht. The Netherlands. pp: 197-246.
- Kawano, T., and T. Furuichi. 2007. Salicylic acid and reactive oxygen species in the activation of stress defense genes (Chapter 10). *In: Hayat, S., and A. Ahmad (eds). Salicylic Acid-A Plant Hormone.* Springer, Dordrecht. The Netherlands. pp: 277-321.
- Larqué-Saavedra, A., and R. L. Wain. 1974. Abscisic acid levels in relation to drought tolerance in varieties of *Zea mays* L. *Nature* 251(5477):716-717.
- Larqué-Saavedra, A., and R. Martín-Mex. 2007. Effects of salicylic acid on the bioproductivity of plants (Chapter 2). *In: Hayat, S., and A. Ahmad (eds). Salicylic Acid-A Plant Hormone.* Springer, Dordrecht. The Netherlands. pp: 15-23.

estudio podría vincularse con la sugerencia de estos autores en el sentido de que el AS induce la floración, al seguir una vía metabólica nueva e independiente. Además, el uso de AS podría ser una nueva herramienta para que biólogos moleculares diluciden los genes y mecanismos que regulan la floración, dado que este proceso no se comprende del todo.

Los hallazgos del presente estudio podrían ser importantes para su uso práctico en la horticultura ornamental.

CONCLUSIONES

Se estableció una curva dosis-respuesta para determinar el efecto de concentraciones bajas de AS en el número de flores en plantas de petunia. El AS a 1 μ M incrementó hasta en 72 % el número de flores por planta, en comparación con el control. El AS indujo la floración en petunia en comparación al testigo seis días antes.

—Fin de la versión en Español—

---*---

- López-Delgado, H., M. E. Mora-Herrera, H. A. Zavaleta-Mancera, M. Cadena-Hinojosa, and I. M. Scott. 2004. Salicylic acid enhances heat tolerance and potato virus X (PVX) elimination during thermotherapy of potato microplants. *Am. J. Potato Res.* 81:171-176.
- Luo J. P., S. T. Jiang, and L. J. Pan. 2001. Enhanced somatic embryogenesis by salicylic acid of *Astragalus adsurgens* Pall.: relationship with H₂O₂ production and H₂O₂-metabolizing enzyme activities. *Plant Sci.* 161:125-132.
- Mahdavian K., K.M. Kalantari, M. Ghorbanli, and M. Torkzade, 2008. The effects of salicylic acid on pigment contents in ultraviolet radiation stressed pepper plants. *Biol. Plant.* 52 (1): 170-172.
- Martín-Mex, R., E. Villanueva-Couoh, T. Herrera-Campos, and A. Larqué-Saavedra. 2005. Positive effect of salicylates on the flowering of African violet. *Scientia Horticulturae*; 103 499-502.
- Martínez, C., E. Pons, G. Prats, and J. León. 2003. Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *Plant J.* 37:2 209-217.
- Mouhu, K., T. Hytönen, K. Folta, M. Rantanen, L. Paulin, P. Auvinen, and P. Elomaa. 2009. Identification of flowering genes in strawberry, a perennial SD plant. *BMC Plant Biol.* 9:122.
- Quiroz-Figueroa F, M. Méndez-Zel, A. Larqué-Saavedra, and V.M. Loyola-Vargas. 2001. Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. *Plant Cell Rep.* 20:679-684.
- Raskin, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 43:439-463.

San Miguel R., M. Gutiérrez and A. Larqué-Saavedra. 2003. Salicylic acid increases the biomass accumulation of *Pinus patula*. *Appl. Forestry*, 27:52-54.

SAS Institute Inc. 2003. The Analyst Application. Second Edition. Cary, NC, USA. 500 p.

Shah, J. 2003. The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 6:365-371.

Senaratna T., D. Touchell, E. Bunn, and K. Dixon. 2000. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Reg.* 30:157-161.