

Yield and anthocyanin concentration in *Hibiscus sabdariffa* L. with foliar application of micronutrients

Rendimiento y concentración de antocianinas en *Hibiscus sabdariffa* L. con aplicación foliar de micronutrientos

Patricio Apáez-Barríos^{1*}; Martha Elena Pedraza-Santos¹; María de las Nieves Rodríguez-Mendoza²; Yurixhi Atenea Raya-Montaño¹; David Jaén-Contreras²

¹Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Agrobiología. Paseo Lázaro Cárdenas s/n esq. Berlín, Colonia Viveros, Uruapan, Michoacán, C. P. 60190, MÉXICO.

²Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, México, C. P. 56230, MÉXICO.

*Corresponding author: patrick280485@gmail.com, tel. (452) 523 38 58.

Abstract

The consumption of nutraceutical foods, such as extracts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces, improve health and prevent several diseases, attributable in part to the activity of their anthocyanins. Exposure of plants to high concentrations of some heavy metals stimulates the synthesis of anthocyanins; therefore, the objective of this study was to determine the effect of foliar application of Zn and Cu at high concentrations on calyx yield, anthocyanin content and physicochemical characteristics in three roselle genotypes. The Criolla Guerrero, Criolla Michoacán and Reina Roja genotypes were sown under rainfed conditions. The foliage of the plants in vegetative stage was sprayed with Zn and Cu solutions separately, making in total four applications of 300 mg·L⁻¹. Both elements reduced the calyx yield in Criolla Guerrero, did not modify it in Criolla Michoacán and in Reina Roja the Zn increased the yield by 15.9 %, achieving 1,232 kg·ha⁻¹. In all genotypes, the applications of these elements improved the content of anthocyanins and titratable acidity and decreased the content of ascorbic acid. Criolla Michoacán had the highest increase in anthocyanins, with 187 % Cu and with 175 % Zn; however, this genotype did not exceed the final anthocyanin content in Reina Roja, which with Cu recorded 22.68 mg·g⁻¹. Therefore, the application of these elements is an alternative to increase the content of anthocyanins, to which some nutraceutical qualities are attributed.

Keywords: titratable acidity, ascorbic acid, antioxidants, roselle.

Resumen

El consumo de alimentos nutraceuticos, como los extractos de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), mejoran la salud y previenen varias enfermedades, esto atribuido en parte a la actividad de sus antocianinas. La exposición de las plantas a concentraciones altas de algunos metales pesados estimula la síntesis de antocianinas; por ello, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la aplicación foliar de Zn y Cu a concentraciones altas sobre el rendimiento de cálices, contenido de antocianinas y características físico-químicas en tres genotipos de jamaica. Se sembraron los genotipos Criolla Guerrero, Criolla Michoacán y Reina Roja bajo condiciones de lluvia estacional. El follaje de las plantas en etapa vegetativa se asperjó con soluciones de Zn y Cu por separado, realizando en total cuatro aplicaciones de 300 mg·L⁻¹. Ambos elementos redujeron el rendimiento de cálices en Criolla Guerrero, no lo modificaron en Criolla Michoacán y en Reina Roja el Zn incrementó el rendimiento en 15.9 %, logrando 1,232 kg·ha⁻¹. En todos los genotipos, las aplicaciones de estos elementos mejoraron el contenido de antocianinas y acidez titulable, y disminuyeron el contenido de ácido ascórbico. Criolla Michoacán presentó el mayor incremento de antocianinas, con Cu 187 % y con Zn 175 %; sin embargo, este genotipo no superó al contenido final de antocianinas en Reina Roja, que con Cu registró 22.68 mg·g⁻¹. Por lo que la aplicación de estos elementos es una alternativa para incrementar el contenido de antocianinas, a las cuales se les atribuyen algunas cualidades nutraceuticas.

Palabras clave: acidez titulable, ácido ascórbico, antioxidantes, jamaica.



Introduction

Functional foods produce beneficial physiological effects when consumed on a regular basis because they are a source of biologically active components. In general, they are said to improve health, so they are used in the treatment and prevention of various diseases (Norberto et al., 2013). These properties are associated with the presence of phytochemicals such as glucosinolates (sulfur compounds in the Alliaceae but mainly in Brassicaceae), terpenoids (carotenoids, monoterpenoids and phytosterols) and several groups of polyphenols (mainly flavones, isoflavones, stilbenes, ellagic acid and anthocyanins) (Chen, Remondetto, & Subirade, 2006).

Anthocyanins give the red and blue color to plant organs such as fruits, flowers and leaves (Pojer, Mattivi, Johnson, & Stockley, 2013). This type of polyphenol has pharmacological properties such as reduction of coronary disease and anticancer, antitumor, anti-inflammatory and antidiabetic effects; in addition, they improve visual acuity and cognitive behavior. The pharmacological effects of anthocyanins are related to their antioxidant activity (Hopkins, Lamm, Funk, & Ritenbaugh, 2013; Kim, Joo, & Yoo, 2009).

An important source of anthocyanins is roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces, which are consumed mainly as refreshing drinks (Prenci, Berto, Daniele, & Taso, 2007). The color of *Hibiscus* calyces varies from yellowish green to deep red and is related to the content of these phytochemicals (Christian & Jackson, 2009). Thus, the varieties of dark calyces have an anthocyanin concentration five to seven times greater than that of clear calyces; on the other hand, the green and yellow varieties lack these compounds (Salinas-Moreno, Zúñiga-Hernández, Jiménez-de la Torre, Serrano-Altamirano, & Sánchez-Feria, 2012).

The environmental conditions during roselle production have a direct effect on the content of the main polyphenols present in the calyces. Depending on the production site, the amount of anthocyanins can even double in some varieties (Juliani et al., 2009). The increase in the anthocyanin content in the calyces could improve the nutraceutical quality and thereby increase the product's value. Currently, in roselle marketing, the most important quality criteria are the acidity of the extracts and the anthocyanin content; the latter is related to the number of extractions that can be made from the calyces (Galicia-Flores, Salinas-Moreno, Espinosa-García, & Sánchez-Feria, 2008).

Various types of stress in plants, such as pathogen attack, UV-B radiation, low temperatures, N limitations, and drought, as well as the application of pro-oxidant compounds such as H₂O₂, salicylic acid or heavy metals (copper, chromium, zinc, iron, nickel, cobalt),

Introducción

Los alimentos funcionales producen efectos fisiológicos benéficos al ser consumidos de manera regular, debido a que son fuente de componentes biológicamente activos. En general, se dice que mejoran la salud, por lo que se utilizan en el tratamiento y prevención de diversas enfermedades (Norberto et al., 2013). Dichas propiedades se asocian a la presencia de fitoquímicos como glucosinolatos (compuestos de azufre en las aliáceas pero principalmente en brassicáceas), terpenoides (carotenoides, monoterpenoides y fitosteroles) y varios grupos de polifenoles (principalmente flavonas, isoflavonas, estilbenos, ácido elágico y antocianinas) (Chen, Remondetto, & Subirade, 2006).

Las antocianinas otorgan el color rojo y azul a órganos de plantas como frutos, flores y hojas (Pojer, Mattivi, Johnson, & Stockley, 2013). Este tipo de polifenoles tienen propiedades farmacológicas como reducción de la enfermedad coronaria y efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además, mejoran la agudeza visual y el comportamiento cognitivo. Los efectos farmacológicos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante (Hopkins, Lamm, Funk, & Ritenbaugh, 2013; Kim, Joo, & Yoo, 2009).

Como fuente importante de antocianinas destacan los cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.); las cuales se consumen principalmente como bebidas refrescantes (Prenci, Berto, Daniele, & Taso, 2007). El color de los cálices de *Hibiscus* varía desde verde amarillento hasta rojo intenso, y se encuentra relacionado con el contenido de estos fitoquímicos (Christian & Jackson, 2009). Así, las variedades de cálices oscuros contienen entre cinco y siete veces más concentración de antocianinas que las de cálices claros; por su parte, las variedades verdes y amarillas carecen de estos compuestos (Salinas-Moreno, Zúñiga-Hernández, Jiménez-de la Torre, Serrano-Altamirano, & Sánchez-Feria, 2012).

Las condiciones ambientales en la producción de jamaica tienen un efecto directo en el contenido de los principales polifenoles presentes en los cálices. De acuerdo con el sitio de producción, la cantidad de antocianinas puede incluso duplicarse en algunas variedades (Juliani et al., 2009). El incremento en el contenido de antocianinas en los cálices podría mejorar la calidad nutraceutica y con ello aumentar el valor del producto. Actualmente, en la comercialización de jamaica, los criterios de calidad más importantes son la acidez de los extractos y el contenido de antocianinas; este último se relaciona con el número de extracciones que pueden realizarse a partir de los cálices (Galicia-Flores, Salinas-Moreno, Espinosa-García, & Sánchez-Feria, 2008).

can cause changes in metabolism and thus modify the concentration of flavonoids (Xing, Huang, & Liu, 2010). Exposure to heavy metals can cause an increase in the production of reactive species or free radicals such as superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals (Stohs & Bagchi, 1995). Under these conditions the genes of some plants are activated and modulate the biosynthesis of flavonoids such as anthocyanins; consequently, the levels of these phytochemicals increase during exposure to stress (Hernández, Alegre, van Breusegem, & Munné-Bosch, 2009). The inductive synthesis of anthocyanins is the result of the activation of genes and is carried out in order to increase the antioxidant response of the plant to maintain the physiological status of tissues, directly or indirectly affected by stress (Ling-Peng, Xin-Jiao, & Hai-Hu, 2012).

Anthocyanins have the ability to protect the plant against oxidative stress, due to their ability to stabilize the unpaired electrons of free radicals, this by donating hydrogen atoms. It has been reported that anthocyanins have greater antioxidant capacity than vitamins C and E (Hernández et al., 2009; Sytar et al., 2013). In addition, various types of anthocyanins such as 3-sambubioside of delphinidin and 3-sambubioside of cyanidin, present in roselle calyces, also have the ability to form complexes with metals and thus protect the plant against harmful effects (Castañeda-Ovando, Galán-Vidal, Pacheco-Hernández, Rodríguez, & Páez-Hernández, 2009; Galicia-Flores et al., 2008).

In some plant species such as *Arabidopsis thaliana*, *in vitro* exposure to essential metals (Cu, Zn and Mn) and non-essential ones (Pb and Hg) stimulated the synthesis of anthocyanins; this effect was proportional to the element dose (Baek et al., 2012). Cu at a dose of 250 μM was the most effective to increase polyphenol levels from 2 to 32.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of fresh matter (FM) and with Zn the maximum increase was with 1,000 μM (14 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FM). However, high doses of these elements reduced root and shoot length in *A. thaliana* (Baek et al., 2012). The application of other elements such as As also caused an increase in the anthocyanin concentration; thus, in *Lemna gibba* the highest content of these metabolites was found with 1.5 mg of As per L (45 $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ FM) (Alves-Leão, Alves-de Oliveira, Arantes-Felipe, Santos-Fernese, & Soares-Gusman, 2014). In *Atriplex hortensis* var. *Purpurea* and *A. rosea* exposed to treatments with different concentrations of Cu, Ni, Pb and Zn, no changes were observed in the anthocyanin concentration (Sai et al., 2015). According to Alves-Leão et al. (2014), plants respond differently to heavy metal stress, depending on the type of metal, the concentration and the duration of the stress.

In roselle calyces it has been documented that the application of cobalt sulphate and nickel (20 to 25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of soil, respectively) increased the concentration of anthocyanins and other flavonoids (Aziz, Gad, &

Diversos tipos de estrés en las plantas, como el ataque de patógenos, radiación UV-B, temperaturas bajas, limitaciones de N, sequía, así como la aplicación de compuestos prooxidantes como H_2O_2 , ácido salicílico o metales pesados (cobre, cromo, zinc, hierro, níquel, cobalto), pueden causar cambios en el metabolismo y así modificar la concentración de flavonoides (Xing, Huang, & Liu, 2010). La exposición a metales pesados puede ocasionar incremento en la producción de especies reactivas o radicales libres como el superóxido, el peróxido de hidrogeno y radicales hidroxilo (Stohs & Bagchi, 1995). Bajo estas condiciones los genes de algunas plantas se activan y modulan la biosíntesis de flavonoides como las antocianinas; en consecuencia, los niveles de estos fitoquímicos se incrementan durante la exposición al estrés (Hernández, Alegre, van Breusegem, & Munné-Bosch, 2009). La síntesis inductiva de antocianinas es el resultado de la activación de genes y se realiza con la finalidad de incrementar la respuesta antioxidante de la planta para mantener el estatus fisiológico de tejidos, directa o indirectamente afectado por el estrés (Ling-Peng, Xin-Jiao, & Hai-Hu, 2012).

Las antocianinas tienen la capacidad de proteger a la planta contra el estrés oxidativo, debido a su capacidad de estabilizar los electrones desapareados de los radicales libres, esto mediante la donación de átomos de hidrógeno. Se ha reportado que las antocianinas tienen mayor capacidad antioxidante que las vitaminas C y E (Hernández et al., 2009; Sytar et al., 2013). Además, diversos tipos de antocianinas como la 3-sambubiósido de delfinidina y la 3-sambubiósido de cianidina, presentes en cálices de jamaica, también tienen la capacidad de formar complejos con metales y de esta manera proteger a la planta contra efectos dañinos (Castañeda-Ovando, Galán-Vidal, Pacheco-Hernández, Rodríguez, & Páez-Hernández, 2009; Galicia-Flores et al., 2008).

En algunas especies de plantas como *Arabidopsis thaliana*, la exposición *in vitro* a metales esenciales (Cu, Zn y Mn) y no esenciales (Pb y Hg) estimuló la síntesis de antocianinas; dicho efecto fue proporcional a la dosis del elemento (Baek et al., 2012). El Cu a dosis de 250 μM fue el más eficaz para incrementar los niveles de polifenoles de 2 a 32.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de materia fresca (MF) y con Zn el aumento máximo fue con 1,000 μM (14 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF). No obstante, dosis altas de estos elementos redujeron la longitud de raíces y brotes en *A. thaliana* (Baek et al., 2012). La aplicación de otros elementos como As también provocó aumento en la concentración de antocianinas; de esta manera, en *Lemna gibba* el contenido mayor de estos metabolitos se encontró con 1.5 mg de As por L (45 $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ de MF) (Alves-Leão, Alves-de Oliveira, Arantes-Felipe, Santos-Fernese, & Soares-Gusman, 2014). En *Atriplex hortensis* var. *Purpurea* y *A. rosea* expuestas a tratamientos con distintas concentraciones de Cu, Ni, Pb y Zn no se observaron

Badran, 2007); however, foliar application could make this response more efficient. On the other hand, Zn and Cu are nutrients sold as foliar fertilizers and, because they are essential elements, they help improve plant nutrition, which also results in a better agricultural yield. Studies on the induction of oxidative stress in roselle cultivation through the application of heavy metals to increase the anthocyanin concentration are limited, so the objective of the present research was to determine the effect of foliar application of Zn and Cu at high concentrations on calyx yield, anthocyanin concentration and physicochemical characteristics in three roselle genotypes.

Materials and methods

Study location

The experiment was established in the field under rainfed conditions in the town of Cajones, belonging to the municipality of Gabriel Zamora, Michoacán, Mexico (19° 10' 49" North latitude and 101° 58' 13" West longitude, at 503 masl). The area has an Aw₀ climate, corresponding to warm subhumid with summer rains (García, 2004).

Establishment of the experiment and application of treatments

On July 8, 2015, the following roselle genotypes were sown: Criolla Guerrero (CG), Criolla Michoacán (CM) and Reina Roja (RR) (Figure 1), which are highly marketed in Guerrero and Michoacán. For the study, the seeds were provided by some producers of these states. The three genotypes were subjected to foliar sprays with Zn and Cu separately, and to the control (without foliar application, 0). The combination of genotypes with treatments generated nine combinations (CG-0, CG-Zn, CG-Cu, CM-0, CM-Zn, CM-Cu, RR-0, RR-Zn, RR-Cu), which were distributed in the field under a randomized complete block experimental design in a split-plot arrangement, with four replications. The large plot was the genotype and the small plot the micronutrients. In total there were 36 experimental units, each with three furrows 3 m long and 0.8 m apart. Two seeds per plant were sown every 0.5 m for a population density of five plants per m². From 15 days after emergence, foliar applications were made up to dripping point with 300 mg·L⁻¹ of zinc (Zn) and copper (Cu), plus a control without spraying. In total, four applications were made each with seven-day intervals.

The sources of the micronutrients were: zinc sulfate heptahydrate (ZnSO₄·7H₂O) and cupric sulfate pentahydrate (CuSO₄·5H₂O). Additionally, 1 mL·L⁻¹ of Inex[®] adherent was added to each mixture. For its application, a 15-L capacity pump equipped with an empty (hollow) cone nozzle was used.

cambios en la concentración de antocianinas (Sai et al., 2015). De acuerdo con Alves-Leão et al. (2014), las plantas responden de manera diferente al estrés por metales pesados, lo cual depende del tipo de metal, la concentración y la duración del estrés.

En cálices de jamaica se ha documentado que la aplicación de sulfato de cobalto y de níquel (20 a 25 mg·kg⁻¹ de suelo, respectivamente) incrementaron la concentración de antocianinas y de otros flavonoides (Aziz, Gad, & Badran, 2007); sin embargo, la aplicación vía foliar podría hacer más eficiente esta respuesta. Por otra parte, el Zn y Cu son nutrimentos que se venden como fertilizantes foliares y, por tratarse de elementos esenciales, contribuyen a mejorar la nutrición de la planta, lo que además ocasiona un mejor rendimiento agrícola. Los estudios sobre la inducción de estrés oxidativo en el cultivo de jamaica mediante la aplicación de metales pesados para incrementar la concentración de antocianina son limitados, por lo que el objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de la aplicación foliar de Zn y Cu a concentraciones altas sobre el rendimiento de cálices, concentración de antocianinas y características físico-químicas en tres genotipos de jamaica.

Materiales y métodos

Localización del estudio

El experimento se estableció en campo bajo condiciones de lluvia estacional en la población de Cajones, perteneciente al municipio Gabriel Zamora, Michoacán, México (19° 10' 49" latitud norte y 101° 58' 13" longitud oeste, a 503 msnm). El clima de este lugar es Aw₀ que corresponde a cálido subhúmedo con lluvias en verano (García, 2004).

Establecimiento del experimento y aplicación de tratamientos

El 8 de julio de 2015 se realizó la siembra de los genotipos de jamaica: Criolla Guerrero (CG), Criolla Michoacán (CM) y Reina Roja (RR) (Figura 1); los cuales son altamente comercializados en Guerrero y Michoacán. Para el estudio, las semillas fueron proporcionadas por productores de estos estados. Los tres genotipos se sometieron a aspersiones foliares con Zn y Cu por separado, y al testigo (sin aplicación foliar, 0). La combinación de genotipos con tratamientos generó nueve combinaciones (CG-0, CG-Zn, CG-Cu, CM-0, CM-Zn, CM-Cu, RR-0, RR-Zn, RR-Cu), que se distribuyeron en campo bajo un diseño experimental de bloques completos al azar en arreglo de parcelas divididas, con cuatro repeticiones. La parcela grande fue el genotipo y la parcela chica los micronutrientes. En total fueron 36 unidades experimentales, cada una con tres surcos de 3 m de longitud y separación de 0.8 m. Se sembraron

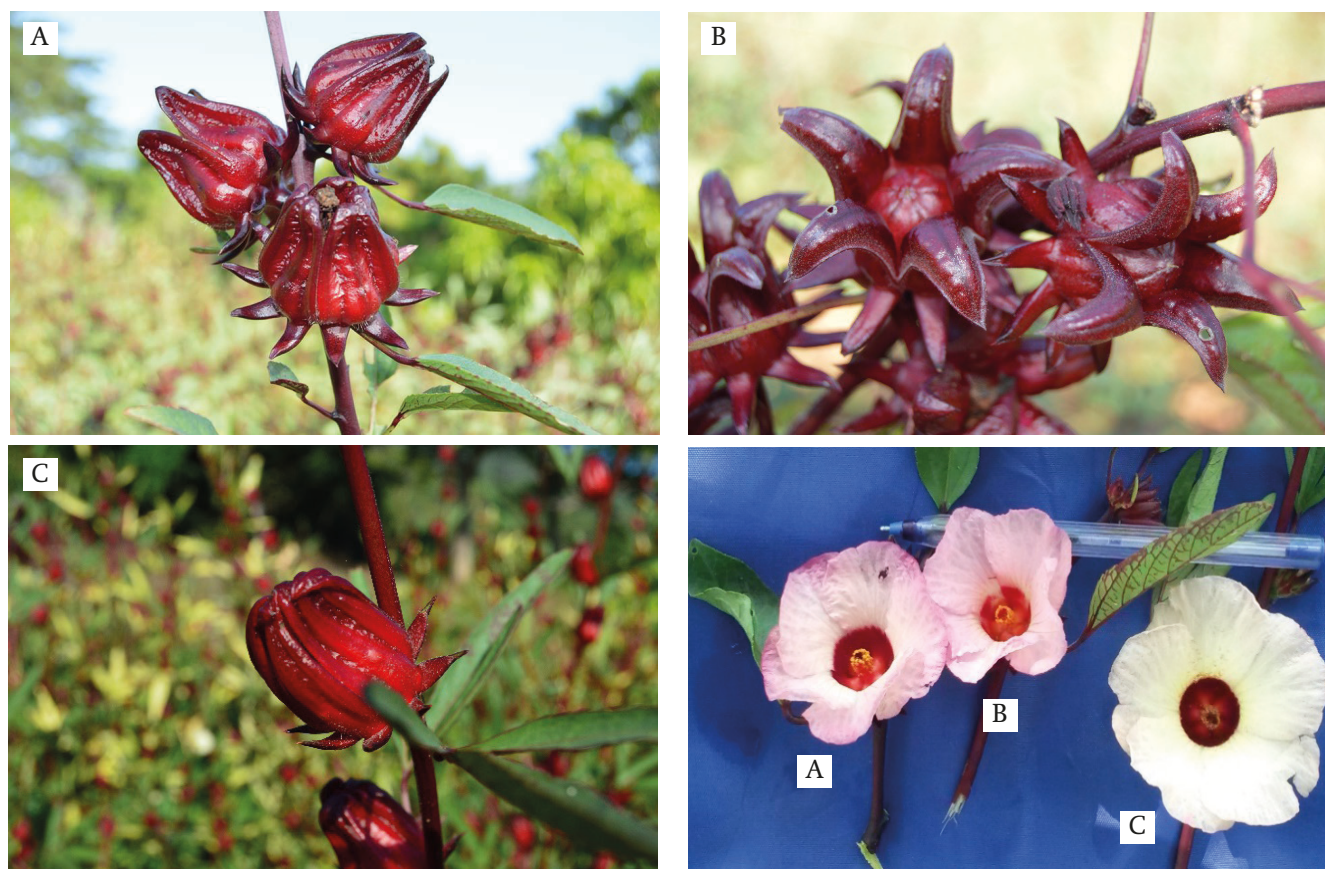


Figure 1. Roselle genotypes used in the study: A) Criolla Guerrero, B) Reina Roja and C) Criolla Michoacán.

Figura 1. Genotipos de jamaica utilizados en el presente estudio: A) Criolla Guerrero, B) Reina Roja y C) Criolla Michoacán.

Soil fertilization was carried out with 80 and 40 kg·ha⁻¹ of N and P₂O₅, applied as urea (46-0-0) and triple calcium superphosphate (0-46-0). In addition, 100 % P₂O₅ and 50 % N were applied at 15 days after sowing (das), and the rest of the N at 45 das.

Determination of yield and its components

The harvest was carried out at physiological maturity, when the fruits started with brown coloration and the seeds presented black coloration. This stage varied among genotypes; in Criolla Guerrero and Reina Roja it occurred at approximately 145 das and in Criolla Michoacán at 156 das. Calyces without fruit were harvested from the central row of each experimental unit, and in these structures the following yield components were measured: length and diameter of calyces, number of calyces per plant and weight of 10 calyces. Subsequently, they were dried in a forced-air circulation oven at 50 °C until constant weight.

Determination of physicochemical characteristics in dry calyces

Aqueous extracts were prepared in duplicate from each replication of the different treatments, for which 15 g of calyces in dry matter basis were pulverized in

dos semillas por mata cada 0.5 m para una densidad de población de cinco plantas por m². A partir de los 15 días después de la emergencia se realizaron aplicaciones foliares hasta punto de goteo con 300 mg·L⁻¹ de zinc (Zn) y de cobre (Cu), más un testigo sin aspersión. En total se realizaron cuatro aplicaciones cada una con intervalos de siete días.

Las fuentes de los micronutrientes fueron: sulfato de zinc heptahidratado (ZnSO₄·7H₂O) y sulfato cúprico pentahidratado (CuSO₄·5H₂O). Adicionalmente, a cada mezcla se le agregó 1 mL·L⁻¹ de adherente Inex®. Para su aplicación, se utilizó una bomba de 15 L de capacidad equipada con una boquilla de cono vacío (hueco).

La fertilización al suelo se realizó con 80 y 40 kg·ha⁻¹ de N y P₂O₅, aplicados como urea (46-0-0) y superfosfato de calcio triple (0-46-0). Además, se aplicó 100 % de P₂O₅ y 50 % de N a los 15 días después de la siembra (dds), y el resto del N a los 45 dds.

Determinación del rendimiento y componentes del rendimiento

La cosecha se realizó a madurez fisiológica, cuando los frutos iniciaron con coloración café y las semillas presentaron coloración negra. Esta etapa varió entre

a mill (IKA® brand, model MF 10) with 0.5-mm mesh. From the powder, 2.5 g were weighed and placed in 250-mL glass bottles (Schott Duran® brand), where 200 mL of distilled water were added. The mixture was left to stand for 24 h at room temperature in the dark, after which the extracts were placed in a water bath at 40 °C for 15 min. The obtained extracts were measured for: pH with a Beckman pH Meter® potentiometer (method 981.12), total soluble solids (method 932.12) with an ATAGO® digital refractometer (0 to 32 % scale), titratable acidity as a percentage of citric acid present (method 942.15) and ascorbic acid content (method 967.21) with 2,6-dichlorophenolindophenol. The determinations were made according to the methodology of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1980).

The anthocyanin concentration was determined with the Abdel-Aal and Hucl (1999) method, for which 100 mg of each pulverized sample were weighed and transferred to centrifuge tubes, after which 10 mL of acidified methanol extractor solution (methanol: 1.5 N HCl at a ratio of 85:15 v/v) were added. The mixture was left to stand for 24 h in dark conditions at 4 °C. Subsequently, to avoid variation in the volume of the extractor solution due to evaporation, it was filled to the initial volume. The samples were centrifuged at 5,000 rpm for 20 min in a Heraeus™ Biofuge Primo R centrifuge. A 1:10 dilution (100 µL of the concentrated extract + 900 µL of acidified methanol) was made. Finally, the absorbance of the diluted extract was read at a wavelength of 533 nm in a Genesys® 10 UV (Thermo Spectronic) spectrophotometer; the extractor solution was used as the target.

The anthocyanin content was estimated as equivalents of cyanidin-3-glucoside with the equation: $A = (Ab/\epsilon)(Ve/1,000)PM(1/Ph)(10^6)$, where A is the anthocyanin content, Ab is the absorbance of the extract, ϵ is the molar extinction coefficient of cyanidin-3-glucoside (25,965 cm⁻¹.mol⁻¹), Ve is the total volume of the extract, PM is the molecular weight of the cyanidin-3-glucoside (449) and Ph is the weight of the sample. The total anthocyanin content was expressed in mg of anthocyanins per g of dry matter of calyces.

Statistical analysis

The data of the variables were analyzed using an analysis of variance and Tukey's range test ($P \leq 0.05$), both with the Statistical Analysis System package (SAS, 2002).

Results and discussion

Calyx yield and its components

Applying Zn and Cu did not statistically modify ($P \leq 0.05$) the length and diameter of calyces but

genotipos, en Criolla Guerrero y Reina Roja ocurrió aproximadamente a los 145 dds y en Criolla Michoacán a los 156 dds. Del surco central de cada unidad experimental se cosecharon los cálices sin fruto, y en estas estructuras se midieron los componentes del rendimiento: longitud y diámetro de cálices, número de cálices por planta y peso de 10 cálices. Posteriormente, se secaron en una estufa de circulación de aire forzado a 50 °C hasta peso constante.

Determinación de características físico-químicas en cálices secos

De cada repetición de los diferentes tratamientos se prepararon por duplicado extractos acuosos; para lo cual, 15 g de cálices en base seca se pulverizaron en un molino (marca IKA® modelo MF 10) con malla de 0.5 mm. Del polvo se pesaron 2.5 g que se colocaron en frascos de vidrio (marca Schott Duran®) de 250 mL, en donde se agregaron 200 mL de agua destilada. La mezcla se dejó reposar 24 h a temperatura ambiente en oscuridad, posteriormente los extractos se colocaron en baño maría a 40 °C por 15 min. En los extractos obtenidos se midió: pH con un potenciómetro Beckman pH Meter® (método 981.12), sólidos solubles totales (método 932.12) con un refractómetro digital marca ATAGO® (escala 0 a 32 %), acidez titulable como porcentaje del ácido cítrico presente (método 942.15) y contenido de ácido ascórbico (método 967.21) con 2,6-diclorofenolindofenol. Las determinaciones se realizaron de acuerdo con la metodología de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1980).

La concentración de antocianinas se determinó con el método de Abdel-Aal y Hucl (1999), para lo cual se pesaron 100 mg de cada muestra pulverizada y se transfirieron a tubos de centrifuga, a cada muestra se le agregaron 10 mL de solución extractora de metanol acidificado (metanol: HCl 1.5N en proporción 85:15 v/v). La mezcla se dejó reposar por 24 h en condiciones de oscuridad a 4 °C. Posteriormente, para evitar variación en el volumen de la solución extractora por efecto de evaporación, se aforó al volumen inicial. Las muestras se centrifugaron a 5,000 rpm por 20 min en una centrifuga Heraeus™ Biofuge Primo R. Se realizó una dilución 1:10 (100 µL del extracto concentrado + 900 µL de metanol acidificado). Finalmente, se leyó la absorbancia del extracto diluido a una longitud de onda de 533 nm en un espectrofotómetro Genesys® 10 UV (Termo Spectronic), como blanco se usó la solución extractora.

El contenido de antocianinas se estimó como equivalentes de cianidina-3-glucósido con la ecuación: $A = (Ab/\epsilon)(Ve/1,000)PM(1/Ph)(10^6)$, donde A es la concentración de antocianinas, Ab es la absorbancia del extracto, ϵ es el coeficiente de extinción molar de la cianidina-3-glucósido (25,965 cm⁻¹.mol⁻¹), Ve es el volumen total del extracto, PM es el peso molecular

reduced the number of calyces per plant in Criolla de Guerrero and Reina Roja. In these same genotypes, the Zn significantly increased the weight of the calyces, while the Cu favored this variable only in Reina Roja (Tables 1 and 2). This generated variation in yield in the genotype x micronutrient interaction; thus, in Criolla Guerrero the foliar supply of these micronutrients reduced yield; with Zn the decrease was 21 % and with Cu 12 %, although these reductions did not differ statistically ($P \leq 0.05$). This result can be attributed to the fact that these elements caused, in the Criolla Guerrero plants, reductions in the size of the plant canopy (leaf area index) and in stem diameter; on average, these variables were 15 % lower than in plants without application.

Xing, Huang, and Liu (2010) mention that in some plants the use of heavy metals at high concentrations

de la cianidina-3-glucósido (449) y P_h es el peso de la muestra. El contenido total de antocianinas se expresó en mg de antocianinas por g de materia seca de cálices.

Análisis estadístico

Los datos de las variables se analizaron mediante un análisis de varianza y prueba de comparación de medias entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$), ambos con el paquete *Statistical Analysis System* (SAS, 2002).

Resultados y discusión

Rendimiento de cálices y componentes del rendimiento

La aplicación de Zn y Cu no modificó estadísticamente ($P \leq 0.05$) la longitud y diámetro de cálices, pero

Table 1. Significance level of the variables evaluated in roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyces.

Cuadro 1. Nivel de significancia de las variables evaluadas en cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*).

| Factor | Yield/ Rendimiento | Length/ Longitud | Diameter/ Diámetro | No. of calyces per plant/ Núm. de cálices por planta | Weight of 10 calyces/ Peso de 10 cálices |
|--|-----------------------|---------------------|-----------------------|---|---|
| Genotype (G)/ Genotipo (G) | ** | ** | ** | ** | ** |
| Micronutrient (M)/ Micronutrimiento (M) | ns | ns | ns | ** | ** |
| G x M interaction/ Interacción G x M | ** | ** | * | ** | ** |

*, ** $P \leq 0.01$ and 0.05 , respectively; ns = not significant ($P \geq 0.05$)

*, ** $P \leq 0.01$ y 0.05 , respectivamente; ns = no significativo ($P \geq 0.05$)

Table 2. Comparison of means test of the variables evaluated in roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyces.

Cuadro 2. Prueba de comparación de medias de las variables evaluadas en cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*).

| Genotypes/ Genotipos | Micronutrient/ Micronutrimiento | Length (cm)/ Longitud (cm) | Diameter (cm)/ Diámetro (cm) | Number of calyces/ Número de cálices | Weight of 10 calyces (g)/ Peso de 10 cálices (g) |
|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---|---|
| Criolla | 0 ¹ | 3.5 c ² | 3.4 ab | 32.6 bc | 4.35 e |
| Guerrero | Zn | 3.6 c | 3.6 ab | 23.5 d | 4.78 d |
| | Cu | 3.8 bc | 3.7 a | 30.7 c | 4.05 e |
| Criolla | 0 | 3.1 c | 2.0 d | 34.8 ab | 3.42 f |
| Michoacán | Zn | 3.2 c | 2.0 d | 36.4 a | 3.27 f |
| | Cu | 3.3 c | 2.0 d | 34.3 ab | 3.08 f |
| Reina Roja | 0 | 4.5 ab | 2.9 c | 17.3 e | 7.83 c |
| | Zn | 4.8 a | 3.1 bc | 14.9 ef | 11.03 b |
| | Cu | 4.4 ab | 2.9 c | 12.9 f | 11.82 a |
| Overall mean/ Media general | | 3.81 | 2.80 | 26.35 | 5.96 |
| LSD/DMSH | | 0.80 | 0.48 | 3.03 | 0.37 |
| CV (%) | | 8.10 | 6.80 | 4.80 | 12.30 |

¹0 = no application of micronutrients, Zn = application of Zn, Cu = application of Cu, LSD = least significant difference, CV = coefficient of variation.

²Means with the same letters within each column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

¹0 = sin aplicación de micronutrientes, Zn = aplicación de Zn, Cu = aplicación de Cu, DMSH = diferencia mínima significativa honesta, CV = coeficiente de variación.

²Medias con letras iguales dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

causes oxidative stress, due to the production of reactive species that damage cellular components such as DNA, proteins and lipids, which affects crop growth and yield. Some plants have a mechanism to tolerate heavy metal stress such as metal exclusion, metal accumulation and metal binding with proteins rich in cysteine and metalloproteins. In addition, some compounds in plants that act as markers can stimulate the antioxidant system to combat oxidative damage in tissues as part of their metabolism or defense mechanism (Thounaojam et al., 2012). Thus, in Criolla Michoacán, applying these elements did not cause significant changes ($P \leq 0.05$), while in Reina Roja, Zn increased the yield by 15.9 %, so this combination presented the highest calyx yield ($1,232 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) of all treatments evaluated (Figure 2).

The results indicate that the genotypes studied showed a different degree of sensitivity to high concentrations of foliar-supplied micronutrients ($300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ per application), a response that can also be attributed to the differences among genotypes. In this sense, Reina Roja has thicker and larger leaves than the other two genotypes; likewise, Criolla Michoacán is the genotype with the longest growth cycle. Both characteristics may have reduced the stress caused by the application of heavy metals. Differences in the effect resulting from the application of these micronutrients have been

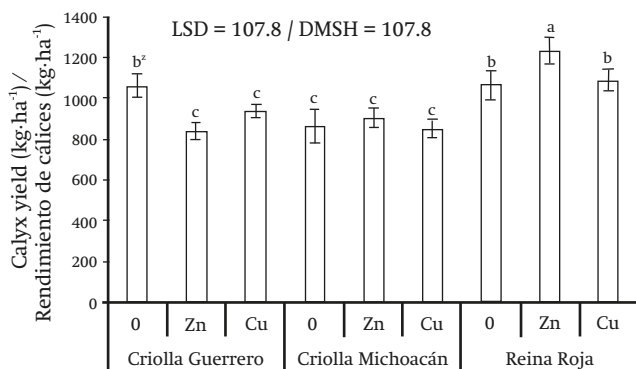


Figure 2. Dry calyx yield of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) as a function of the genotype and application of micronutrients. 0 = no application of micronutrients, Zn = application of Zn, Cu = application of Cu and LSD = least significant difference. ^zMeans with the same letters between bars do not differ statistically ($P \leq 0.05$).

Figura 2. Rendimiento de cálices secos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en función del genotipo y aplicación de micronutrientes. 0 = sin aplicación de micronutrientes, Zn = aplicación de Zn, Cu = aplicación de Cu y DMSH = diferencia mínima significativa honesta. ^zMedias con letra igual entre barras no difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$).

redujeron el número de cálices por planta en Criolla de Guerrero y Reina Roja. En estos mismos genotipos, el Zn incrementó de manera significativa el peso de los cálices, mientras que el Cu favoreció esta variable solo en Reina Roja (Cuadros 1 y 2). Esto generó variación en el rendimiento en la interacción genotipo x micronutriente; así, en Criolla Guerrero el suministro foliar de estos micronutrientes redujeron el rendimiento, con Zn la disminución fue 21 % y con Cu 12 %, aunque estas reducciones no difirieron estadísticamente ($P \leq 0.05$). Dicho resultado puede ser atribuido a que estos elementos provocaron, en las plantas de Criolla Guerrero, reducciones en el tamaño del dosel vegetal (índice de área foliar) y en el diámetro del tallo; en promedio, estas variables fueron 15 % menores que en plantas sin aplicación.

Xing, Huang, y Liu (2010) mencionan que en algunas plantas el uso de metales pesados en concentraciones altas provoca estrés oxidativo, debido a la producción de especies reactivas que dañan los componentes celulares como el ADN, proteínas y lípidos, lo que afecta el crecimiento y rendimiento de los cultivos. Algunas plantas presentan mecanismo para tolerar el estrés por metales pesados como la exclusión del metal, acumulación del metal y la unión de estos con proteínas ricas en cisteína y metaloproteínas. Además, algunos compuestos en las plantas que actúan como señalizadores pueden estimular el sistema antioxidante para combatir los daños oxidativos en los tejidos como parte de su metabolismo o mecanismo de defensa (Thounaojam et al., 2012). Así, en Criolla Michoacán, la aplicación de estos elementos no provocaron modificaciones significativas ($P \leq 0.05$); mientras que en Reina Roja, el Zn incrementó el rendimiento 15.9 %, por lo que esta combinación presentó el rendimiento de cálices más alto ($1,232 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) de todos los tratamientos evaluados (Figura 2).

Los resultados indican que los genotipos estudiados mostraron diferente grado de sensibilidad a las altas concentraciones de micronutrientes suministrados vía foliar ($300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ por aplicación); respuesta que también puede ser atribuida a las diferencias entre genotipos. En este sentido, Reina Roja presenta hojas de mayor grosor y tamaño que los otros dos genotipos; asimismo, Criolla Michoacán es el genotipo con el ciclo de cultivo más prolongado. Ambas características pudieron haber reducido el estrés provocado por la aplicación de metales pesados. Las diferencias en el efecto a la aplicación de estos micronutrientes se han observado en otros cultivos agrícolas como trigo (*Triticum aestivum* L.), arroz (*Oryza sativa* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), ya que solo en algunos casos el rendimiento agrónomo se mejoró con el uso de Zn (Ram et al., 2016).

Resultados similares a los de este trabajo en Reina Roja con aplicación foliar de Zn son reportados por Aziz

observed in other agricultural crops such as wheat (*Triticum aestivum* L.), rice (*Oryza sativa* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), since only in some cases was the agronomic yield improved with the use of Zn (Ram et al., 2016).

Results similar to those of this work in Reina Roja with foliar application of Zn are reported by Aziz et al. (2007), who mention that in roselle with soil-supplied Co (20 and 40 mg·kg⁻¹) and Ni (25 and 50 mg·kg⁻¹), separately and combined, they obtained an increase in the yield of fresh and dry calyces of up to 137 %, where the yield component that was most favored was the number of fruits. Similarly, the cultivars 'Jumbo,' 'Drakkar,' 'Cossair' and 'Pactol' of *Brassica napus* L. subjected to concentrations of 2,000 µM ZnSO₄ and 250 µM CdCl₂ showed variation in dry matter production. ZnSO₄ increased 'Jumbo' production by 71 %, while in the other cultivars it caused reductions of 34 % and Cd in all genotypes caused a 40 % reduction in their yields (Ghnaya, Charles, Hourmant, Hamida, & Branchard, 2009). This confirms the fact that each species responds differently to heavy metal stress (Alves-Leão et al., 2014).

Regardless of the application of heavy metals, it was found that Reina Roja presented the highest calyx yield, followed by Criolla Guerrero and Criolla Michoacán, this as a result of the Reina Roja calyces being the longest and heaviest. The genotype with the largest calyx diameter was Criolla Guerrero, while Criolla Michoacán had more calyces per plant, but both had the least weight (Table 2). This shows variation in yield and yield components among these genotypes. Similar results were found by Atta et al. (2011) in roselle ecotypes grown in the field under warm weather and seasonal rainfall conditions in Nigeria.

Physicochemical characteristics of calyx extract

Applying Cu and Zn at high doses caused highly significant differences ($P \leq 0.01$) in titratable acidity and in anthocyanin and ascorbic acid contents, and in none of the genotypes was the pH or total soluble solids modified (Table 3). However, because the Criolla Guerrero calyces were less acidic, in any combination with micronutrients, they presented the highest pH values in comparison with the other treatments (Table 4).

The titratable acidity response resulting from the supply of micronutrients varied depending on the genotype. In Criolla Guerrero an increase of 41 % was recorded with Zn and 33.7 % with Cu, while in Reina Roja no significant differences ($P \leq 0.05$) were detected and in Criolla Michoacán the Cu reduced titratable acidity by 15.6 %. Of all the combinations of treatments, Criolla

et al. (2007), quienes mencionan que en jamaica con suministro al suelo de Co (20 y 40 mg·kg⁻¹) y Ni (25 y 50 mg·kg⁻¹), por separado y combinaciones, obtuvieron un incremento en el rendimiento de cálices frescos y secos de hasta 137 %, donde el componente del rendimiento que más se favoreció fue el número de frutos. De igual manera, los cultivares 'Jumbo', 'Drakkar', 'Cossair' y 'Pactol' de *Brassica napus* L. sometidos a concentraciones de 2,000 µM de ZnSO₄ y 250 µM de CdCl₂ presentaron variación en la producción de materia seca. El ZnSO₄ aumentó 71 % la producción de 'Jumbo', mientras que en los otros cultivares ocasionó reducciones de 34 % y el Cd en todos los genotipos provocó el abatimiento de 40 % en sus rendimientos (Ghnaya, Charles, Hourmant, Hamida, & Branchard, 2009). Lo anterior confirma el hecho de que cada especie responde de manera diferente al estrés por metales pesados (Alves-Leão et al., 2014).

Independientemente de la aplicación de metales pesados, se encontró que Reina Roja presentó el rendimiento de cálices más alto, seguido de Criolla Guerrero y Criolla Michoacán, esto como consecuencia de que los cálices de Reina Roja fueron los más largos y de mayor peso. El genotipo con el diámetro de cálices mayor fue Criolla Guerrero, mientras que Criolla Michoacán presentó más cálices por planta, pero ambos fueron los de menor peso (Cuadro 2). Esto demuestra variación en el rendimiento y en los componentes del rendimiento entre estos genotipos. Resultados similares fueron encontrados por Atta et al. (2011) en ecotipos de jamaica cultivados en campo bajo condiciones de clima cálido y lluvia estacional en Nigeria.

Características físico-químicas del extracto de cálices

La aplicación de Cu y Zn en dosis elevadas provocó diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) en la acidez titulable, contenidos de antocianinas y de ácido ascórbico, y en ninguno de los genotipos modificó el pH ni los sólidos solubles totales (Cuadro 3). Sin embargo, por ser menos ácidos los cálices de Criolla Guerrero, en cualquier combinación con micronutrientes, estos presentaron los valores más elevados de pH en comparación con los otros tratamientos (Cuadro 4).

La respuesta de acidez titulable por suministro de micronutrientes varió en función del genotipo. En Criolla Guerrero se registró un aumento de 41 % con Zn y 33.7 % con Cu, mientras que en Reina Roja no se detectaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) y en Criolla Michoacán el Cu redujo la acidez titulable en 15.6 %. De todas las combinaciones de tratamientos, Criolla Michoacán sin aplicación de estos metales y con Zn presentó el más alto porcentaje de acidez titulable, y el más bajo correspondió a Criolla Guerrero.

Table 3. Significance level of the physicochemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyces.**Cuadro 3. Nivel de significancia de las características físico-químicas de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*).**

| Factor | pH | Total soluble solids / Sólidos solubles totales | Titrateable acidity / Acidez titulable | Anthocyanins / Antocianinas | Ascorbic acid / Ácido ascórbico |
|--|----|---|--|--------------------------------|------------------------------------|
| Genotype (G)/ Genotipo (G) | ** | ns | ** | ** | ** |
| Micronutrients (M)/ Micronutrientos (M) | ns | ns | ** | ** | ** |
| G x M interaction / Interacción G x M | ns | ns | ** | ** | ** |

*, ** $P \leq 0.01$ and 0.05 , respectively; ns = not significant ($P \geq 0.05$).

*, ** $P \leq 0.01$ y 0.05 , respectivamente; ns = no significativo ($P \geq 0.05$).

Table 4. Comparison of means test of the physicochemical characteristics evaluated in roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyces.**Cuadro 4. Prueba de comparación de medias de las características físico-químicas evaluadas en cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*).**

| Genotypes / Genotipos | Micronutrient / Micronutriente | pH | Total soluble solids (%) / Sólidos solubles totales (%) | TA (%) / AT (%) | Ascorbic acid (mg·100 g ⁻¹) / ácido ascórbico (mg·100 g ⁻¹) |
|--------------------------|-----------------------------------|---------------------|---|--------------------|--|
| Criolla | 0 ¹ | 3.93 a ² | 0.45 a | 8.3 d | 59.9 bc |
| Guerrero | Zn | 3.90 a | 0.45 a | 11.7 c | 39.2 ef |
| | Cu | 3.92 a | 0.42 a | 11.1 c | 33.0 f |
| | 0 | 3.38 c | 0.37 a | 21.2 a | 82.4 a |
| Michoacán | Zn | 3.36 c | 0.45 a | 23.1 a | 48.7 d |
| | Cu | 3.43 c | 0.42 a | 17.9 b | 44.2 de |
| | 0 | 3.64 b | 0.37 a | 12.2 c | 66.7 b |
| Reina Roja | Zn | 3.62 b | 0.40 a | 12.0 c | 62.2 b |
| | Cu | 3.58 b | 0.37 a | 12.2 c | 51.0 cd |
| | Overall mean / Media general | 3.64 | 0.41 | 14.4 | 54.15 |
| LSD / DMSH | 0.15 | 0.12 | 1.82 | 9.21 | |
| CV (%) | 1.3 | 12.90 | 5.23 | 5.74 | |

¹0 = no application of micronutrients, Zn = application of Zn, Cu = application of Cu, LSD = least significant difference, CV = coefficient of variation

²Means with the same letters within each column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

¹0 = sin aplicación de micronutrientos, Zn = aplicación de Zn, Cu = aplicación de Cu, DMSH = diferencia mínima significativa honesta, CV = coeficiente de variación.

²Medias con letras iguales dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

Michoacán without application of these metals and with Zn presented the highest percentage of titrateable acidity, and the lowest was in Criolla Guerrero.

In most cases, the ascorbic acid concentration decreased when Cu and Zn were applied. Criolla Michoacán showed the greatest reduction, 40.9 % with Zn and 55.8 % with Cu. In Criolla Guerrero with Zn sprayings, the calyces presented 34.6 % less ascorbic acid and with Cu the decrease was 44.9 %, while in Reina Roja the Cu caused a 23.5 % decrease in ascorbic acid (Table 4).

With Zn and Cu, the anthocyanin concentration increased in all genotypes. The highest increase was

En la mayoría de los casos, la concentración de ácido ascórbico disminuyó cuando se aplicó Cu y Zn. Criolla Michoacán mostró mayor reducción, 40.9 % con Zn y de 55.8 % con Cu. En Criolla Guerrero con aspersiones de Zn, los cálices presentaron 34.6 % menos de ácido ascórbico y con Cu el decremento fue de 44.9 %, mientras que en Reina Roja el Cu causó la disminución de 23.5 % de ácido ascórbico (Cuadro 4).

Con Zn y Cu, la concentración de antocianinas incrementó en todos los genotipos. En Criolla Michoacán se registró el mayor aumento, donde se aplicó Zn los cálices registraron 175 % más de antocianinas y 187 % con Cu. En Criolla Guerrero,

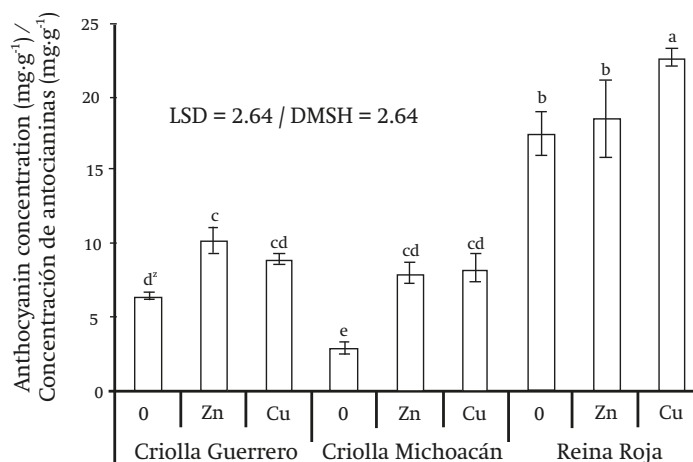


Figure 3. Anthocyanin concentration in roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyces as a function of the genotype and application of micronutrients. 0 = no application of micronutrients, Zn = application of Zn, Cu = application of Cu and LSD = least significant difference. ^aMeans with the same letters do not differ statistically ($P \leq 0.05$).

Figura 3. Concentración de antocianinas en cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en función del genotipo y aplicación de micronutrientes. 0 = sin aplicación de micronutrientes, Zn = aplicación de Zn, Cu = aplicación de Cu y DMSH = diferencia mínima significativa honesta. ^aMedias con letras iguales entre barras no difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$).

recorded in Criolla Michoacán, where the calyces had 175 % more anthocyanins when Zn was applied and 187 % more with Cu. In Criolla Guerrero, Zn increased the anthocyanin content by 60 % and Cu by 39 %. The lowest increase occurred in Reina Roja calyces; with Cu, the anthocyanin concentration rose by 30 %, whereas with Zn it did not statistically differ ($P \leq 0.05$) from the control treatment. However, due to the high anthocyanin content in the Reina Roja control, more than double that of Criolla Guerrero and Criolla Michoacán, this genotype recorded 22.7 mg·g⁻¹ anthocyanins in the dry calyces with the foliar application of Cu, higher than all treatment combinations (Figure 3).

Anthocyanins are pigments produced by secondary metabolism that can increase their concentration in plants in response to oxidative stress, caused by several factors, including exposure to high concentrations of metals (Azis et al., 2007). In the present study, the foliar administration of Cu and Zn solutions (300 mg·L⁻¹) at concentrations higher than those required by the crops caused the three roselle genotypes to increase the anthocyanin content in their calyces with respect to the control. The antioxidative properties of anthocyanins arise from their high reactivity as electron donors, from the ability of radicals to stabilize and delocalize the unpaired electron and from their ability to chelate transition metal ions (Alves-Leão et al., 2014).

Results similar to those of the present study have been documented in several crops, such as duckweed (*Lemna gibba*) by exposure to arsenic (Alves-Leão et al., 2014), in

el Zn incrementó 60 % el contenido de antocianinas y el Cu 39 %. El incremento más bajo lo presentaron los cálices de Reina Roja, con Cu 30 % y con Zn la concentración de antocianinas no difirió estadísticamente ($P \leq 0.05$) al tratamiento testigo. No obstante, debido al contenido alto de antocianinas en el testigo de Reina Roja, más del doble que Criolla Guerrero y Criolla Michoacán, este genotipo registró 22.7 mg·g⁻¹ de antocianinas en los cálices secos con la aplicación foliar de Cu, superior a todas las combinaciones de tratamientos (Figura 3).

Las antocianinas son pigmentos producidos por el metabolismo secundario que pueden incrementar su concentración en las plantas como respuesta al estrés oxidativo, causado por diversos factores, entre ellos la exposición a concentraciones altas de metales (Azis et al., 2007). En el presente estudio, el suministro vía foliar de soluciones de Cu y Zn (300 mg·L⁻¹) a concentraciones superiores a las requeridas por los cultivos provocaron que los tres genotipos de jamaica aumentaran el contenido de antocianinas en sus cálices con respecto al testigo. Las propiedades antioxidantes de las antocianinas surgen de su alta reactividad como donadores de electrones, de la capacidad de los radicales para estabilizar y deslocalizar al electrón no apareado y de su capacidad para quelar los iones metálicos de transición (Alves-Leão et al., 2014).

Resultados similares a los del presente estudio se han documentado en varios cultivos, como en lenteja de agua (*Lemna gibba*) por exposiciones con arsénico

Arabidopsis thaliana under *in vitro* conditions by addition of Cu, Zn, Mn, Pb and Hg to the culture medium (Baek et al., 2012) and in *Capsicum annum* with foliar application of Cu and Zn to the young leaves (Stavreva-Veselinovska, Ziranovik, & Djokic, 2010).

With the use of Zn and Cu the percentage of titratable acidity increased, which is important since the acidity has an antibacterial effect and contributes to the absorption of metal ions in the human body. In addition, the sensation of freshness perceived when drinking a cold roselle drink is related to this characteristic (Prenești et al., 2007). Both Cu and Zn reduced the ascorbic acid content in all genotypes, an effect contrary to what happened with anthocyanins. In this regard, it has been found that the ascorbic acid content in roselle calyces is inversely proportional to the anthocyanin concentration (Salinas-Moreno et al., 2012). Although ascorbic acid also has antioxidant activity, it is lower than that of anthocyanins (Hernández et al., 2009; Sytar et al., 2013).

Conclusions

Applying Cu and Zn reduced calyx yield in the Criolla Guerrero genotype, in Criolla Michoacán they did not modify it and in Reina Roja only the Zn improved it; in turn, these elements increased the amount of anthocyanins and decreased the concentration of ascorbic acid. In Criolla Michoacán, the greatest increases in anthocyanins were recorded, so it was the genotype where the nutraceutical quality was improved the most. The titratable acidity in Criolla Guerrero and Criolla Michoacán was higher with Zn and Cu.

Reina Roja was the most outstanding genotype as it presented the highest calyx yield and anthocyanin concentration.

Acknowledgments

The authors thank the National Science and Technology Council (CONACYT) for the support granted (271812), corresponding to the postdoctoral scholarship, and the Postharvest Fruit Laboratory of the *Colegio de Postgraduados* Montecillo Campus for the facilities granted to carry out the physical and chemical analyses.

(Alves-Leão et al., 2014), en *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones *in vitro* por la adición al medio de cultivo de Cu, Zn, Mn, Pb y Hg (Baek et al., 2012) y en *Capsicum annum* con la aplicación foliar de Cu y Zn a las hojas jóvenes (Stavreva-Veselinovska, Ziranovik, & Djokic, 2010).

Con el uso de Zn y Cu se incrementó el porcentaje de acidez titulable, lo cual es importante, ya que la acidez tiene un efecto antibacterial y contribuye a la absorción de iones metálicos en el cuerpo humano. Además, la sensación de frescura percibida al tomar una bebida fría de jamaica está relacionada con esta característica (Prenești et al., 2007). Tanto el Cu como el Zn redujeron el contenido de ácido ascórbico en todos los genotipos, efecto contrario a lo ocurrido con las antocianinas. Al respecto, se ha encontrado que el contenido de ácido ascórbico en cálices de jamaica es inversamente proporcional a la concentración de antocianinas (Salinas-Moreno et al., 2012). Aunque el ácido ascórbico también presenta actividad antioxidante, ésta es menor a la que tienen las antocianinas (Hernández et al., 2009; Sytar et al., 2013).

Conclusiones

La aplicación de Cu y Zn redujo el rendimiento de cálices en el genotipo Criolla Guerrero, en Criolla Michoacán no lo modificaron y en Reina Roja solo el Zn mejoró su rendimiento; a su vez, estos elementos aumentaron la cantidad de antocianinas y disminuyeron la concentración de ácido ascórbico. En Criolla Michoacán se registraron los incrementos mayores en antocianinas, por lo que fue el genotipo en donde más se mejoró su calidad nutraceutica. La acidez titulable en Criolla Guerrero y Criolla Michoacán fue mayor con Zn y Cu.

La Reina Roja fue el genotipo más sobresaliente por presentar el rendimiento de cálices y concentración de antocianinas más elevados.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado (271812), correspondiente a la beca de posdoctorado, y al Laboratorio de Poscosecha de Frutales del *Colegio de Postgraduados* Campus Montecillo por las facilidades otorgadas para realizar los análisis físicos y químicos.

End of English version

Fin de la versión en español

References / Referencias

- Abdel-Aal, E. S., & Hucl, P. (1999). A Rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*, 76(3), 350-354. doi: 10.1094/CCHEM.1999.76.3.350
- Alves-Leão, G., Alves-de Oliveira, J., Arantes-Felipe, R. T., Santos-Fernese, F., & Soares-Gusman, G. (2014). Anthocyanins, thiols, and antioxidant scavenging enzymes are involved in *Lemna gibba* tolerance to arsenic. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 143-151. doi: 10.1080/17429145.2013.784815
- Association of Official Analytical Chemists, International (AOAC). (1980). *Official Methods of Analysis of AOAC*. Washington, D. C. USA.: Author.
- Atta, S., Seyni, H. H., Bakasso, Y., Sarr, B., Lona, I., & Saadou, M. (2011). Yield character variability in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *African Journal Agricultural Research*, 6(6), 1371-1377. doi: 10.5897/AJAR10.334
- Aziz, E. E., Gad, N., & Badran, N. M. (2007). Effect of cobalt and nickel on plant growth, yield and flavonoids content of *Hibiscus sabdariffa* L. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(2), 73-78. Retrieved from <http://ajbasweb.com/old/ajbas/73-78.pdf>
- Baek, S. A., Han, T., Ahn, S. K., Kang, H., Cho, M. R., Lee, S. C., & Im, K. H. (2012). Effects of heavy metals on plant growths and pigment contents in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Pathology Journal*, 28(4), 446-452. doi: 10.5423/PPJ.NT.01.2012.0006
- Castañeda-Ovando, A., Galán-Vidal, C. A., Pacheco-Hernández, M. L., Rodríguez, J. A., & Páez-Hernández, M. E. (2009). Evaluación del contenido de metales y su efecto en la estabilidad de antocianinas. *CyTA-Journal of Food*, 7(3), 225-232. doi: 10.1080/19476330903092837
- Chen, L., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 17(5), 272-283. doi: 10.1016/j.tifs.2005.12.011
- Christian, K. R., & Jackson, J. C. (2009). Changes in total phenolic and monomeric anthocyanin composition and antioxidant activity of three varieties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) during maturity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(7), 663-667. doi: 10.1016/j.jfca.2009.05.007
- Galicia-Flores, L. A., Salina-Moreno, Y., Espinosa-García, B. M., & Sánchez-Feria, C. (2008). Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 14(2), 121-129. doi: 10.5154/r.rchsh.2007.01.005
- García, E. (2004). *Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen*. México: Instituto de Geografía-Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ghnaya, A. B., Charles, G., Hourmant, A., Hamida, J. B., & Branchard, M. (2009). Physiological behaviour of four rapeseed cultivar (*Brassica napus* L.) submitted to metal stress. *Comptes Rendus Biologies*, 332(4), 363-370. doi: 10.1016/j.crvi.2008.12.001
- Hernández, I., Alegre, L., van Breusegem, F., & Munné-Bosch, S. (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?. *Trends in Plant Science*, 14(3), 125-132. doi: 10.1016/j.tplants.2008.12.003
- Hopkins, A. L., Lamm, M. G., Funk, J. L., & Ritenbaugh, C. (2013). *Hibiscus sabdariffa* L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: A comprehensive review of animal and human studies. *Fitoterapia*, 85, 84-94. doi: 10.1016/j.fitote.2013.01.003
- Juliani, H. R., Welch, C. R., Wu, Q., Diouf, B., Malainy, D., & Simon, J. E. (2009). Chemistry and quality of Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for developing the natural-product industry in Senegal. *Journal of Food Science* 74(2), 113-121. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01076.x
- Kim, S. H., Joo, M. H., & Yoo, S. H. (2009). Structural identification and antioxidant properties of major anthocyanins extracted from omija (*Schizandra chinensis*) fruit. *Journal of Food Science*, 74(2), 134-140. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01049.x
- Ling-Peng, D., Xin-Jiao, D., & Hai-Hu, M. (2012). Molecular mechanism for cadmium-induced anthocyanin accumulation in *Azolla imbricate*. *Chemosphere*, 87(4), 319-325. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.12.005
- Norberto, S., Silva, S., Meireles, M., Faria, A., Pintado, M., & Calhúa, C. (2013). Blueberry anthocyanins in health promotion: A metabolic overview. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1518-1528. doi: 10.1016/j.jff.2013.08.015
- Pojer, E., Mattivi, F., Johnson, D., & Stockley, C. S. (2013). The case for anthocyanin consumption to promote human health: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(5), 483-508. doi: 10.1111/1541-4337.12024
- Prenci, E., Berto, S., Daniele, P. G., & Toso, S. (2007). Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Food Chemistry*, 100(2), 433-438. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.09.063
- Ram, H., Rashid, A., Zhang, W., Duarte, A. P., Phattarakul, N., Simunji, S., ..., & Mahmood, K. (2016). Biofortification of wheat, rice and common bean by applying foliar zinc fertilizer along with pesticides in seven countries. *Plant and Soil*, 403(1-2), 389-401. doi: 10.1007/s11104-016-2815-3
- Sai, K. S., Mansoura, A. B., Ennajah, A., Leclerc, J. C., Ouerghi, Z., & Karray-Bouraooui, N. (2015). Effect of metal toxicity on growth and pigment contents of annual halophyte (*A. hortensis* and *A. rosea*). *International Journal of Environmental Research*, 9(2), 613-620. Retrieved from https://ijer.ut.ac.ir/article_936_1c4e0fd934c64337f4c1ad3a661308f3.pdf
- Salinas-Moreno, Y., Zúñiga-Hernández, A. R. E., Jiménez-de la Torre, L. B., Serrano-Altamirano, V., & Sánchez-Feria, C. (2012). Color en cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y su relación con características fisicoquímicas en sus extractos acuosos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 18(3), 395-407. doi: 10.5154/r.rchsh.2011.08.038
- Statistical Analysis System (SAS Institute). (2002). *SAS User's Guide version 9.0*. Cary N.C., USA: Author.
- Stavreva-Veselinovska, S. T., Ziranovik, J. B., & Djokic, M. M. (2010). Changes of some biochemical and physiological

- parameters in *Capsicum annuum* L. as a consequence of increased concentrations of Copper and Zinc. *Ecologia Balkanica*, 2, 7-13. Retrieved from http://web.uniplovdiv.bg/mollov/EB/2010/EB-02-2010_RA_02.pdf
- Stohs, S. J., & Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine*, 18(2), 321-336. doi: 10.1016/0891-5849(94)00159-H
- Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczynska, P., Strzałka, K., & Prasad, M. N. V. (2013). Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(4), 985-999. doi: 10.1007/s11738-012-1169-6
- Thounaojam, T. C., Panda, P., Mazumdar, P., Kumar, D., Sharma, G. D., Sahoo, L., & Sanjib, P. (2012). Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 53, 33-39. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.01.006
- Xing, W., Huang, W., & Liu, G. (2010). Effect of excess iron and copper on physiology of aquatic plant *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid. *Environmental Toxicology*, 25(2), 103-112. doi: 10.1002/tox.20480