

LA CITOCININA BAP RETRASA SENESCENCIA, AUMENTA ANTIOXIDANTES, PROTEÍNA Y CRECIMIENTO EN EL PASTO OVILLO (*Dactylis glomerata* L.)

THE CYTOKININ BAP DELAYS SENESCENCE AND INCREASES ANTIOXIDANTS, PROTEIN AND GROWTH IN ORCHARD GRASS (*Dactylis glomerata* L.)

Claudia Y. Wilson-García¹, Hilda A. Zavaleta-Mancera^{1*}, Humberto López-Delgado² y Alfonso Hernández-Garay³

¹Botánica, ²Ganadería. Campus Montecillo Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. México. (arazavaleta@colpos.mx). ³Programa Nacional de Papa, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). 52140. Metepec, Estado de México. México.

RESUMEN

La senescencia es una de las principales causas en la reducción de la calidad nutritiva y área verde de los forrajes. Las citocininas promueven el retraso de la senescencia foliar, pero poco se conoce de su efecto en la regulación del estrés oxidativo en forrajes. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la citocinina 6-bencilaminopurina (BAP) en el crecimiento, senescencia, proteína soluble (PS), ácido ascórbico (AA), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y actividad de la ascorbato peroxidasa (APX) en el pasto ovillo (*Dactylis glomerata* L.). Plantas de 10 meses de edad para medir crecimiento y de cuatro meses de edad para evaluar APX, AA, H_2O_2 y proteína soluble (PS) fueron cortadas a 5 cm sobre el nivel del suelo; luego fueron asperjadas semanalmente por siete semanas con una solución BAP 0.1 mM. El diseño experimental fue completamente al azar. Los resultados se analizaron con una ANOVA (SAS, 1995) y las medias se compararon con una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las aspersiones con BAP aumentaron ($p \leq 0.05$) la elongación y el crecimiento de la hoja ($cm\ tallo^{-1}$) en 36% a la semana 17 después del corte. La senescencia foliar acumulada por tallo ($cm\ tallo^{-1}$) se redujo ($p \leq 0.05$) en las plantas con BAP, y se retrasó la senescencia desde la semana 13 después del corte. Las hojas asperjadas con BAP aumentaron ($p \leq 0.05$) su PS en 18% a los 47 d después del corte (DDC) con respecto al registrado a los 14 DDC y superaron ($p \leq 0.05$) en 64% al testigo. En las plantas con retraso de senescencia (BAP) aumentó el contenido de AA, la actividad APX y el H_2O_2 . Se concluye que la citocinina BAP promovió el crecimiento, acumulación de proteína soluble y retrasó la senescencia foliar, regulando la señalización mediante el H_2O_2 en la acumulación de AA y actividad de la APX, con una función protectora ante el estrés oxidativo de la senescencia.

Palabras clave: *Dactylis glomerata*, ácido ascórbico (AA), ascorbato peroxidasa (APX), crecimiento, senescencia, 6-bencilaminopurina.

ABSTRACT

Senescence is one of the main causes in the reduction of forage nutritive quality and green area. Cytokinins promote delay of leaf senescence, but little is known of their effect on regulation of oxidative stress in forages. This study assessed the effect of the cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) on growth, senescence, soluble protein (PS) ascorbic acid (AA), hydrogen peroxide (H_2O_2), and activity of ascorbate peroxidase (APX) in orchard grass (*Dactylis glomerata* L.). Ten-month-old plants were used to measure growth and 4-month-old plants were used to assess APX, AA, H_2O_2 , and soluble protein (PS). After cutting the plants 5 cm above ground level, they were sprayed weekly for seven weeks with a BAP (0.1 mM) solution. The experimental design was completely random. Results were analyzed with ANOVA (SAS, 1995), and means compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$). Spraying with BAP increased ($p \leq 0.05$) leaf elongation and growth ($cm\ stem^{-1}$) by 36% 17 weeks after cutting. Accumulated leaf senescence per stem ($cm\ stem^{-1}$) decreased ($p \leq 0.05$) in plants treated with BAP, and senescence was delayed from week 13 after cutting. Leaves sprayed with BAP increased ($p \leq 0.05$) PS by 18% between 14 and 47 d after cutting and surpassed ($p \leq 0.05$) the control by 64%. In plants with delayed senescence (BAP) the AA content, APX activity, and H_2O_2 increased. It is concluded that the cytokinin BAP promoted growth, accumulation of soluble protein, and delayed leaf senescence, by regulating signaling through H_2O_2 , in AA accumulation and APX activity, with a protective function against the oxidative stress of senescence.

Key words: *Dactylis glomerata*, ascorbic acid, ascorbate peroxidase, growth, senescence, 6-benzylaminopurine.

INTRODUCTION

In intensive livestock production systems alternatives are necessary, such as grazing on orchard grass (*Dactylis glomerata* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), and grasslands associated with alfalfa (*Medicago sativa* L.) in temperate zones. Also, determination of growth curves of forage plants

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Noviembre, 2007. Aprobado: Octubre, 2008.

Publicado como ARTÍCULO en Agrobiencia 42: 799-806. 2008.

INTRODUCCIÓN

En los sistemas intensivos de producción pecuaria se requieren alternativas como la producción en pastoreo, con pasto ovillo (*Dactylis glomerata* L.), ballico perenne (*Lolium perenne* L.) y praderas asociadas con alfalfa (*Medicago sativa* L., en zonas templadas. Además, la determinación de las curvas de crecimiento de las plantas forrajeras (Velasco-Zebadúa *et al.*, 2001) permiten mejorar la productividad y calidad del forraje, reduciendo los efectos de la edad y su deterioro (Hodgson y Brookes, 1999). Los pastos después de la madurez sufren envejecimiento o senescencia foliar, que es un tipo de muerte celular programada y un proceso degenerativo genéticamente regulado (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). En la senescencia foliar hay pérdida de clorofila y de actividad fotosintética; se reducen las proteínas, ARN y el tejido sufre estrés oxidativo con la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO): oxígeno en estado singlete ($^1\text{O}_2$), superóxido (O^{2-}), radicales hidroxilo (OH^-) y H_2O_2 que dañan la célula y contribuyen a la muerte de la planta (Prochazkova *et al.*, 2001). Los principales sistemas antioxidantes en las células vegetales son: 1) compuestos de detoxificación enzimáticos: catalasa (CAT), peroxidasa (POX), superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa; 2) no enzimáticos: ácido ascórbico (AA), carotenoides, antocianinas (Foyer y Noctor, 2005). En condiciones normales estos mecanismos de protección pueden controlar la concentración de ERO y reducir sus efectos (Scandalios, 2005). Durante la senescencia foliar hay un desequilibrio porque aumenta la concentración de ERO y disminuye la producción de antioxidantes. Entonces, un aumento en los mecanismos antioxidantes es determinante en la protección al estrés oxidativo (Foyer y Noctor, 2005).

La citocinina 6-bencilaminopurina (BAP) puede retrasar la senescencia foliar de varias especies (Gan y Amasino 1996), reduciendo la degradación de pigmentos, de proteínas fotosintéticas y membranas cloroplásticas y manteniendo el equilibrio hídrico del tejido (Dangl *et al.*, 2000), pero poco se conoce de su efecto biológico en el crecimiento, contenido de proteína y balance oxidativo en el pasto ovillo. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la citocinina BAP en el crecimiento, senescencia y acumulación de proteína soluble en pasto ovillo, midiendo la respuesta antioxidante enzimática (APX) y no enzimática (AA), y la acumulación de H_2O_2 durante la senescencia.

(Velasco-Zebadúa *et al.*, 2001) can lead to higher productivity and quality in forages, reducing the effects of age and deterioration (Hodgson and Brookes, 1999). Grasses, after maturity, undergo aging or leaf senescence, which is a type of programmed cell death, a degenerative process, genetically regulated (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). During leaf senescence, chlorophyll and photosynthetic activity is lost, proteins and RNA diminish, and tissue suffer oxidative stress from producing reactive oxygen species (ROS): singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), superoxide (O^{2-}), hydroxyl radicals (OH^-) and H_2O_2 damage cells and contribute to the death of the plant (Prochazkova *et al.*, 2001). The main antioxidant systems in plant cells are: 1) enzymatic detoxification compounds; catalase (CAT), peroxidases (POX), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase, 2) non-enzymatic; ascorbic acid (AA), carotenoids, anthocyanins (Foyer and Noctor, 2005). Under normal conditions these protection mechanisms can control the ROS concentration and reduce its effects (Scandalios, 2005). During leaf senescence an imbalance occurs because ROS concentration increases and antioxidant production decreases. Thus, an increase in antioxidant mechanisms is determinant in protection against oxidative stress (Foyer and Noctor, 2005).

The cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) can delay leaf senescence in several species (Gan and Amasino, 1996) by reducing degradation of pigments, photosynthetic proteins, and chloroplastic membranes and by maintaining water balance in the tissue (Dangl *et al.*, 2000), but little is known of its biological effect on growth, protein content, and oxidative balance in orchard grass. Therefore, the present research was conducted to study the effect of the cytokinin BAP on growth, senescence and soluble protein accumulation in orchard grass, measuring the enzymatic (APX) and non-enzymatic (AA) antioxidant response and H_2O_2 accumulation during senescence.

MATERIALS AND METHODS

This study was conducted in the greenhouses of the Botany department of the Colegio de Postgraduados, Montecillo, State of México (48° 27' W and 19° 48' 23" N). An average of 27 orchard grass seeds per pot (30 kg ha⁻¹) were sown in 135 pots (23.5 cm diameter; 20 cm deep) with a 1:1:1 mixture of sandy clay (prevailing in Montecillo), commercial substrate (commercial peat moss, COSMOCEL), and sterile agrolite substrate (Dicalite de México). From sowing (March 3, 2005) to establishment (three months) the plants were watered every other day, and later, every fourth day.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se efectuó en los invernaderos de Botánica, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, (48° 27' O y 19° 48' 23'' N). Se sembró un promedio de 27 semillas de pasto ovillo por maceta (30 kg ha⁻¹) en 135 macetas (23.5 cm diámetro; 20 cm profundidad) con una mezcla 1:1:1 de suelo arcillo-arenoso (prevaliente en Montecillo), sustrato comercial (peat-moss comercial, COSMOCEL) y agrolita estéril (Dicalite de México). Desde la siembra (03 de marzo 2005) a su establecimiento (tres meses) las plantas fueron regadas cada tercer día, y después cada 4 d.

Crecimiento foliar y retraso de senescencia

Se usaron ocho macetas con plantas de 10 meses de edad y se tomaron datos del 31 de enero al 30 de mayo de 2006. Los tratamientos (cuatro macetas en cada uno) fueron: 1) una solución BAP 0.1 mM (0.1 mM 6-bencilaminopurina, 0.02% dimetilsulfóxido (DMSO) y 0.02% Tween 20 en agua); 2) una solución testigo (0.02% DMSO y 0.02% Tween 20 en agua). Se hizo un corte de uniformización a 5 cm del suelo y una semana después se asperjaron semanalmente (en siete ocasiones) con 100 mL de solución de BAP y testigo por maceta, a las 07:00 h.

Las mediciones se hicieron en cinco tallos por maceta, seleccionados al azar (Bircham y Hodgson, 1983). Los tallos se identificaron con etiquetas plásticas de colores. En cada hoja de cada tallo marcado se midió la longitud total de la lámina (distancia de la lígula al ápice); la longitud de la parte verde y la longitud de la parte senescente se calculó por diferencia de las anteriores. Las longitudes de la parte senescente y de la parte verde se sumaron y dividieron entre cinco tallos por repetición, para obtener el promedio por tallo. Los datos se reportan (cm tallo⁻¹) como crecimiento acumulado, senescencia acumulada y crecimiento neto de la hoja (diferencia entre crecimiento acumulado y la senescencia acumulada).

Proteína soluble y actividad antioxidante

En plantas (100 macetas) de cuatro meses de edad (5 de julio) se hizo un corte de uniformidad, a 5 cm del nivel del suelo. El experimento inició el 12 de julio y terminó el 22 de septiembre de 2006. De cada tallo se marcó (corrector tipográfico) la hoja más joven expuesta, para monitorear cada día el crecimiento de las hojas nuevas. Se muestrearon: hojas jóvenes, 7 d después del corte (DDC); parcialmente expandidas, sin lígula expuesta; hojas maduras (14 DDC), con lígula expuesta y totalmente expandidas. Desde 14 DDC edad (hojas maduras) 50 macetas fueron asperjadas semanalmente (siete aspersiones) con solución BAP y 50 con solución testigo. Se muestrearon hojas senescentes (47 DDC) con 30-40% de senescencia y hojas (59 DDC) con 50-60% de senescencia de plantas testigo y asperjadas con BAP. La actividad de ascorbato peroxidasa (APX) se midió según Jiménez *et al.* (1997); el contenido de ácido ascórbico (AA) según Noctor y Foyer (1998) y la proteína soluble (PS) según Bradford (1976). El contenido de H₂O₂ se determinó con el método de quimioluminiscencia (Warm y Laties, 1982).

Leaf growth and delay of senescence

Data were collected from eight pots with 10-month-old plants from January 31 to May 30, 2006. The treatments (four pots each) were: 1) a solution of 0.1 mM BAP (0.1 mM 6-benzylaminopurine, 0.02% dimethylsulfoxide (DMSO) and 0.02% Tween 20 in water); 2) a control solution (0.02% DMSO and 0.02% Tween 20 in water). Plants were cut even to 5 cm above soil and one week later they were sprayed weekly (on seven occasions) with 100 mL per pot of the BAP or control solution at 7:00 o'clock a.m.

Measurements were taken on five stems per pot selected at random (Bircham and Hodgson, 1983). The stems were identified with colored plastic labels. On each leaf of each marked stem, total length of the lamina (distance from ligule to apex); length of the green portion and length of the senescent portion were calculated by subtraction. The lengths of the senescent part and the green part were added and divided by five stems per replication to obtain the average per stem. The data are reported (cm stem⁻¹) as accumulated growth, accumulated senescence, and net leaf growth (difference between accumulated growth and accumulated senescence).

Soluble protein and antioxidant activity

Four-month-old (July 5) plants (100 pots) were cut even at 5 cm above soil level. The experiment began July 12 and ended September 22, 2006. The youngest exposed leaf on each stem was marked (with white out) to monitor daily growth of the new leaves. The following leaves were sampled: young leaves, 7 d after cutting (DAC); partially expanded leaves without exposed ligule; mature leaves (14 DAC) with exposed ligule and totally expanded. From age 14 DAC (mature leaves) 50 pots were sprayed weekly (seven applications) with the BAP solution and 50 with the control solution. Senescent leaves (47 DAC) with 30 to 40% of senescence and leaves (59 DAC) with 50-60% were sampled from the control plants and those sprayed with BAP. Activity of ascorbate peroxidase (APX) was measured following Jiménez *et al.* (1997), ascorbic acid (AA) content following Noctor and Foyer (1998), and soluble protein (PS) following Bradford (1976). The H₂O₂ content was determined with the chemiluminescence method (Warm and Laties, 1982).

Statistical analysis

The experimental design was completely random. The results were analyzed with ANOVA (SAS, 1995) and means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Leaf growth and delay of senescence

Spraying with BAP promoted leaf elongation (accumulated growth, Figure 1A) as of week three after cutting; in week six the treated plants had surpassed ($p \leq 0.05$) the control, and in week 17 accumulated

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar. Los resultados se analizaron con ANOVA (SAS, 1995) y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento foliar y retraso de senescencia

Las aspersiones BAP promovieron la elongación de la hoja (crecimiento acumulado; Figura 1A) desde la semana tres del corte; en la semana seis las plantas tratadas aumentaron ($p \leq 0.05$) su crecimiento con respecto a las testigo y en la semana 17 el crecimiento acumulado fue 36% superior al testigo. En las primeras cuatro semanas el crecimiento neto no fue diferente ($p > 0.05$) entre tratamientos (Figura 1C), mientras que las plantas testigo desde la semana 15 mostraron una caída marcada hasta alcanzar valores negativos, ya que las pérdidas por descomposición superaron al crecimiento foliar. Al respecto, Chapman y Lemaire (1993) mencionan que al final de la curva de acumulación de forraje las pérdidas por senescencia superan al crecimiento foliar. Según Velasco-Zebadúa *et al.* (2001), en pasto ovillo las máximas tasas de crecimiento ocurren en la semana tres de primavera, en la cuarta de verano, en la sexta de otoño y en la séptima de invierno; después las tasas de crecimiento disminuyen debido a un aumento progresivo de tallos y material senescente. El mayor crecimiento en pasto ovillo se relaciona con una promoción de la división y el alargamiento celular, efectos conocidos de las citocininas en cotiledones y hojas de mostaza (*Brassica nigra*) cucurbitáceas (*Cucurbita pepo*) y girasol (*Helianthus annuus*) (Taiz y Zeiger, 2002). Además, la extensión de la pared celular es regulada por auxinas y citocininas; la falta de citocininas detiene la fase G2 del ciclo celular (Jacobs, 1995).

La senescencia acumulada no cambió ($p > 0.05$) en las primeras semanas (Figura 1B), pero desde la semana 11 el BAP redujo la senescencia; en la semana 17, las plantas asperjadas con BAP tuvieron 28.6% menos senescencia que las testigo. Estos resultados son nuevos para el pasto ovillo donde el BAP puede retrasar su senescencia foliar y prolongar la vida de las hojas verdes, como ha sido observado en hojas de otras especies: arroz, *Oriza sativa* (Ookawa *et al.*, 2004); maíz, *Zea mays* (He *et al.*, 2005); trigo, *Triticum aestivum* (Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007) donde el retraso de la senescencia foliar está asociado con retenciones de clorofila (50-70%) y una disminución de clorofilasas, nucleasas y proteasas. Durante la senescencia natural

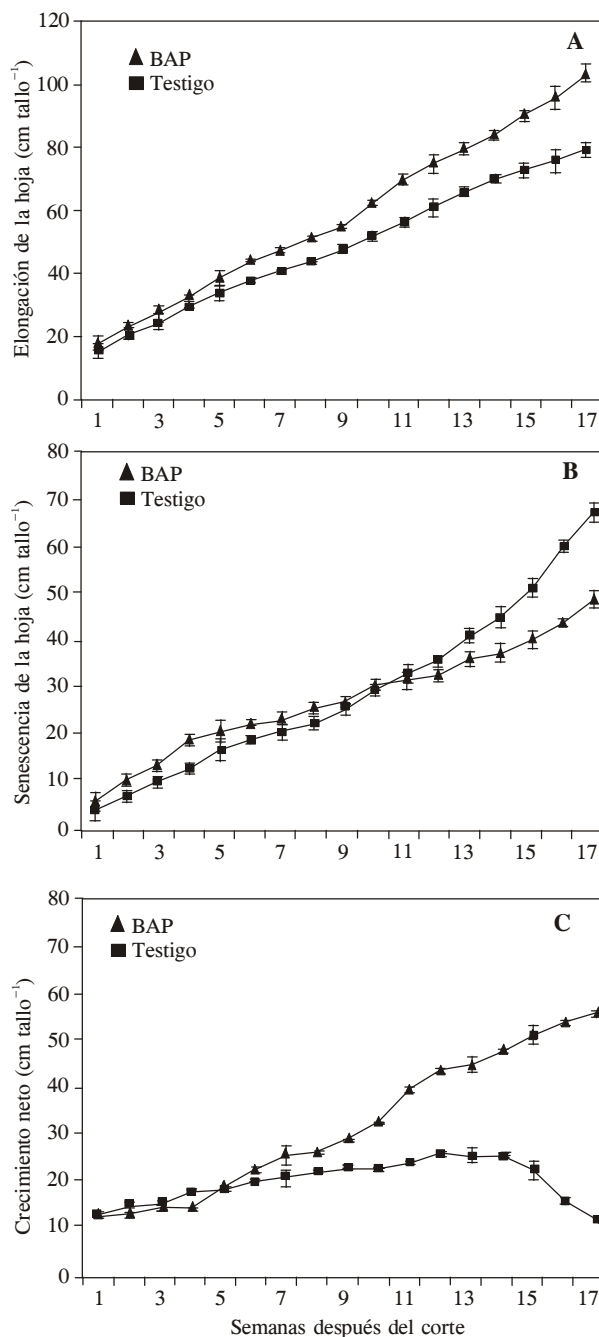


Figura 1. Crecimiento foliar del pasto ovillo asperjado con BAP. Las plantas se asperjaron semanalmente de la semana 3 a la 9 después del corte. (A) Crecimiento acumulado; (B) senescencia acumulada; (C) crecimiento neto. Los datos son promedio $\pm$ error estándar ($n=20$).

Figure 1. Leaf growth of orchard grass sprayed with BAP. Plants were sprayed weekly from week 3 to 9 after cutting. (A) Accumulated growth; (B) accumulated senescence; (C) net growth. Data are average $\pm$ standard error ($n=20$).

growth was 36% more than the control. In the first four weeks net growth was not different ($p > 0.05$)

disminuyen las concentraciones de citocininas en el xilema (Gan y Amasino, 1996); entonces, las aspersiones con BAP compensaron las deficiencias de este regulador en las hojas y retrasaron el envejecimiento en pasto ovillo. Se midió el porcentaje de senescencia en la hoja y no la clorofila en el pasto ovillo, ya que su patrón de senescencia se presenta como muerte foliar, la cual inicia en el ápice y avanza hacia la base de la lámina (basípeta). Además, en forrajes la senescencia se mide como presencia de material muerto (Hernández-Garay *et al.*, 1997; Velasco-Zebadúa *et al.*, 2001).

Contenido de proteína soluble, antioxidantes y peróxido de hidrógeno

En las hojas testigo el mayor contenido de PS (11.0 ± 0.49 mg g⁻¹ tejido) ocurrió a los 14 DDC en hojas maduras, pero luego disminuyó con la edad (Figura 2). A los 47 DDC las hojas presentaron 30-40% de senescencia y 50-60% a los 59 DDC. En contraste, las hojas asperjadas con BAP mantuvieron el contenido de PS e incluso aumentó ($p \leq 0.05$) 18% a los 47 DDC respecto a los 14 DDC, y 64% respecto a las testigo. A los 59 DDC las plantas con BAP tuvieron 2.5 veces más PS que las testigo (senescentes). Estos

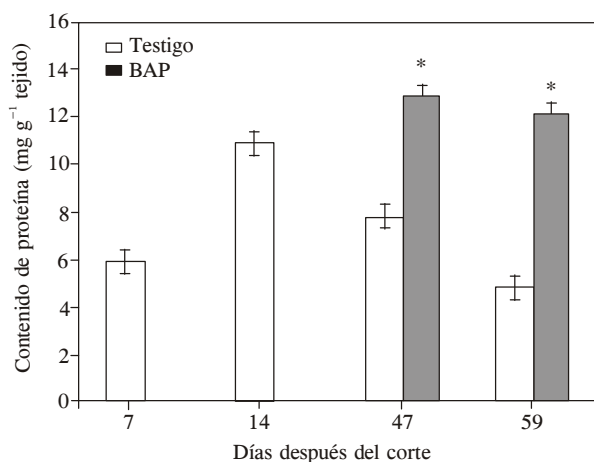


Figura 2. Contenido de proteína soluble en hojas de pasto ovillo asperjadas con BAP. Las plantas se asperjaron semanalmente desde los 14 d después del corte (DDC): 7 DDC (hojas jóvenes); 14 DDC (hojas maduras); 47 DDC (hojas 30-40% senescencia); 59 DDC (hojas 50-60% senescencia). Los datos son promedio $\pm$ error estándar ($n=9$). * Diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

Figure 2. Soluble protein content in orchard grass leaves sprayed with BAP. Plants were sprayed weekly as of 14 days after cutting (DAC): 7 DAC (young leaves); 14 DAC (mature leaves); 47 DAC (30 to 40% senescence in leaves); 59 DAC (50-60% senescence in leaves). Data are average $\pm$ standard error ($n=9$). *Significant differences among treatments ($p \leq 0.05$).

among treatments (Figure 1C), while growth of control plants from week 15 declined markedly until reaching negative values, since losses to decomposition were greater than growth. Chapman and Lemaire (1993) mention that at the end of the forage accumulation curve the losses by senescence exceed the growth and therefore the net accumulation of forage is reduced. According to Velasco-Zebadúa *et al.* (2001), in orchard grass the maximum growth rates occur in the third week of spring, in the fourth week of summer, in the sixth week of autumn, and in the seventh week of winter; after growth rates diminish due to a progressive increase in stems and senescent material. The greater growth in orchard grass is related to promotion of cell division and lengthening, known effects of cytokinins in cotyledons and leaves of mustard (*Brassica nigra*), cucurbitaceae (*Cucurbita pepo*), and sunflower (*Helianthus annuus*) (Taiz and Zeiger, 2002). Furthermore, extension of the cell wall is regulated by auxins and cytokinins; lack of cytokins arrest the G2 phase of the cell cycle (Jacobs, 1995).

Accumulated senescence did not change ($p > 0.05$) in the first weeks (Figure 1B), but as of week 11 BAP reduced senescence; in week 17 plants sprayed with BAP had 28.6% less senescence than the control. These results are new for orchard grass in which BAP can delay leaf senescence and prolong the life of green leaves, as has been observed in leaves of other species: rice, *Oriza sativa* (Ookawa *et al.*, 2004); maize, *Zea mays* (He *et al.*, 2005); wheat, *Triticum aestivum* (Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007). In these species delay of leaf senescence is associated with retention of chlorophyll (50-60%) and a decrease in chlorophyllases, nucleases, and proteases. During natural senescence, cytokinin concentrations decrease in the xylem (Gan and Amasino, 1996); thus, BAP spraying compensated deficiencies of this regulator in leaves and delayed aging in orchard grass. The percentage of senescence, rather than chlorophyll content, was measured in the leaf of orchard grass, since its pattern of senescence appears as leaf death, which begins in the apex and advances toward the base of the lamina (basipetal). Also, in forages senescence is measured in terms of presence of dead material (Hernández-Garay *et al.*, 1997; Velasco-Zebadúa *et al.*, 2001).

Content of soluble protein, antioxidants, and hydrogen peroxide

In control leaves the largest content of PS (11.0 ± 0.49 mg g⁻¹ tissue) occurred 14 DAC in mature leaves, but later decreased with age (Figure 2). At 47 DAC the leaves exhibited 30-40% senescence and 50-60% at 59 DAC. In contrast, leaves sprayed with BAP

resultados concuerdan con lo observado en hojas de trigo, donde aplicaciones de BAP retuvieron 60% de clorofila y 77% de PS (Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007). Las citocininas pueden promover la síntesis de proteínas cloroplásticas, las cuales constituyen 70% de la PS en una hoja verde (Dangl *et al.*, 2000). Así, en el presente experimento, la aplicación de BAP en pasto ovillo retrasó la pérdida de PS durante la senescencia, pero promovió su acumulación a los 47 y 59 DDC.

El contenido de AA aumentó ($p \leq 0.05$) en los primeros 47 DDC ($1.5 \mu\text{mol mg}^{-1}$ tejido), pero disminuyó ($p \leq 0.05$) durante la senescencia (59 DDC) en las plantas testigo (Figura 3A). En contraste, en las hojas asperjadas con BAP el contenido de AA aumentó ($p > 0.05$) a los 47 DDC ($2.1 \mu\text{mol mg}^{-1}$ tejido) y a los 59 DDC ($2.5 \mu\text{mol mg}^{-1}$ tejido) respecto a las plantas testigo (1.5 y $1.2 \mu\text{mol mg}^{-1}$ tejido). La actividad de APX también aumentó ($p \leq 0.05$) a los 47 DDC (27%) y 59 DDC (79.5%) respecto a las hojas testigo (Figura 3B). Estos resultados concuerdan con Liu y Huang (2002) y Zavaleta-Mancera *et al.*, (2007), quienes proponen que las citocininas activan la defensa antioxidante y retrasan el daño oxidativo durante la senescencia.

El BAP puede retrasar el daño oxidativo no sólo induciendo la actividad de algunas enzimas antioxidantes como APX, sino también aumentando el contenido total de AA; esto estimuló la actividad de APX y la capacidad antioxidante en hojas de té (*Camellia sinensis*) (Chen y Asada, 1989). Además, en fragmentos senescentes de trigo incubados en oscuridad, el BAP aumentó la actividad de CAT y APX en contraste con las hojas sin citocinina (Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007). En el presente experimento el análisis de los datos sugiere que mecanismos similares de protección al daño oxidativo en trigo operan en el pasto ovillo con el efecto del BAP: promueven la acumulación de AA, aumentan la actividad de APX, y disminuyen el daño oxidativo característico de la senescencia. Lo anterior previene la peroxidación de ácidos grasos en la membrana y la muerte celular (Scandalios, 2005). Las concentraciones de H_2O_2 en las hoja de pasto ovillo asperjadas con BAP a los 47 DDC (30-40% senescencia) y 59 DDC (50-60% senescencia) superaron ($p \leq 0.05$) a las plantas testigo en 52% y 53% (Figura 4). El H_2O_2 en altas concentraciones puede ser tóxico para la planta, pero también puede funcionar como una molécula señalizadora que induce la expresión de genes de protección al estrés (Neill *et al.*, 2002). Entonces, los aumentos en H_2O_2 en pasto ovillo asperjado con BAP pueden estar asociados con la señalización de genes de defensa al estrés de la senescencia, mientras que el aumento en el contenido de proteína y de actividad APX pueden asociarse a mecanismos de señalización

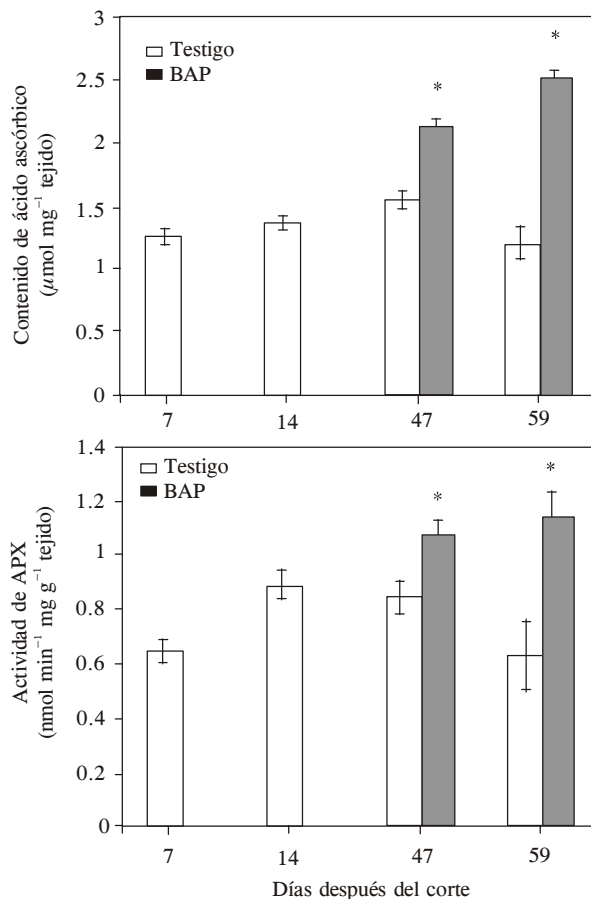


Figura 3. Respuesta antioxidante del pasto ovillo asperjado con BAP. (A) Contenido de ácido ascórbico, AA; (B) actividad de ascorbato peroxidasa, APX. Las plantas se asperjaron semanalmente desde los 14 d después del corte (DDC): 7 DDC (hojas jóvenes); 14 DDC (hojas maduras); 47 DDC (hojas 30-40% senescencia; 59 DDC (hojas 50-60% senescencia). Los datos son promedio $\pm$ error estándar ($n=9$). *Diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

Figure 3. Antioxidant response of orchard grass sprayed with BAP. (A) Ascorbic acid (AA) content; (B) ascorbate peroxidase APX, activity. Plants were sprayed weekly as of 14 days after cutting (DAC): 7 DAC (young leaves); 14 DAC (mature leaves); 47 DAC (30 to 40% senescence in leaves); 59 DAC (50-60% senescence in leaves). Data are average $\pm$ standard error ($n=9$). *Significant differences among treatments ($p \leq 0.05$).

maintained their PS content, which actually increased ($p \leq 0.05$) 18% at 47 DAC relative to 14 DAC, and 64% relative to the control. At 59 DAC, plants with BAP had 2.5 times more PS than the control (senescent) plants. These results coincide with those found in wheat leaves, in which BAP retained 60% of the chlorophyll and 77% of the PS (Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007). Cytokinins can promote synthesis of chloroplastic proteins, which make up 70% of the PS in a green leaf (Dangl *et al.*, 2000). Thus, in our experiment, the application of BAP to orchard grass delayed PS loss

del H_2O_2 por efecto de BAP que condujeron a un retraso en el envejecimiento celular; además, la actividad antioxidante de AA y APX pueden regular la acumulación de H_2O_2 en la señalización, sin ser letales a la célula. En la papa (*Solanum tuberosum*), una acumulación de H_2O_2 indujo tolerancia a choques de calor además, tratamientos con H_2O_2 pueden aumentar la actividad de catalasa (CAT) y la supervivencia de plántulas de papa (*Solanum tuberosum*) a bajas temperaturas en 44 y 92%, según la variedad (Mora-Herrera y López-Delgado, 2006).

CONCLUSIONES

La aplicación de 6-bencilaminopurina BAP (0.1 mM) retrasó la senescencia foliar del pasto ovillo; a las 17 semanas se redujo 28.6% y a los 59 d la PS aumentó 2.5 veces. Además, BAP promovió la acumulación de ácido ascórbico (AA). Se propone que uno de los mecanismos de retraso de senescencia en el pasto ovillo es mediante el aumento de los antioxidantes APX, AA aumentando la protección al daño de membranas durante la senescencia foliar. Entonces, se podría manipular la senescencia en una pradera lo cual ofrece ventajas para su aprovechamiento y manejo, además de los aumentos en proteína y AA que podría mejorar su calidad nutritiva.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el proyecto CONACYT-SEP 43866-Z y es parte de la investigación de maestría del primer autor.

LITERATURA CITADA

- Bircham, J. S., and J. Hodgson. 1983. The influence of sward conditions on rates of herbage growth and senescence in mixed swards under continuous grazing management. *Grass Forage Sci.* 38 (4): 323-331.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Buchanan-Wollaston, V. 1997. The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 48: 181-199.
- Buchanan-Wollaston, V., S. Earl, E. Harrison, E. Mathas, S. Navabpour, and T. Page. 2003. The molecular analysis of leaf senescence-a genomic approach. *Plant Biotechnol. J.* 1:3-22.
- Chapman, D. F., and G. Lemaire. 1993. Morphogenetic and structural determinants of plants regrowth after defoliation. *Proc. XVII Int. Congress. Palmerston North, N. Z.* pp: 95-104.
- Chen, G-X., and K. Asada 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant and Cell Physiol.* 30: 987-998.
- Dangl, J., R.A. Dietrich, and H. Thomas. 2000. Senescence and programed cell death. *In: Buchanan, B. B., W. Gruissem, R. and L. Jones (eds). Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* American Society of Plant Physiologists Press. Rockville, USA. pp: 1044-1100.

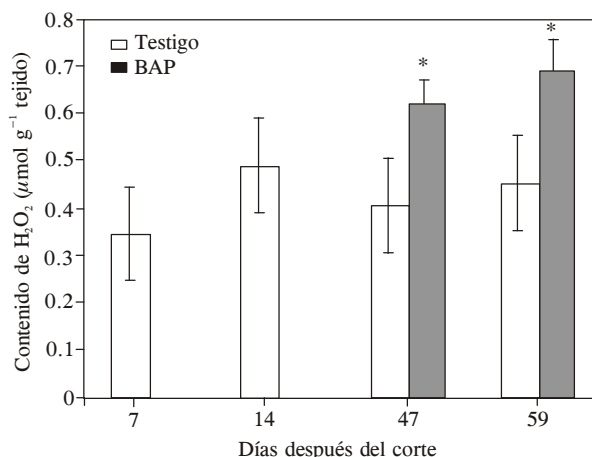


Figura 4. Contenido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en hojas en el pasto ovillo asperjado con BAP. Las plantas se asperjaron semanalmente desde los 14 d después del corte (DDC): 7 DDC (hojas jóvenes); 14 DDC (hojas maduras); 47 DDC (hojas 30-40% senescencia); 59 DDC (hojas 50-60% senescencia). Los datos son promedio $\pm$ error estándar ($n=9$). * Diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

Figure 4. Hydrogen peroxide (H_2O_2) content in orchard grass leaves sprayed with BAP. Plants were sprayed weekly as of 14 days after cutting DAC: 7 DAC (young leaves); 14 DAC (mature leaves); 47 DAC (30 to 40% senescence in leaves); 59 DAC (50-60% senescence in leaves). Data are average $\pm$ standard error ($n=9$). *Significant differences among treatments ($p \leq 0.05$).

during senescence, but promoted its accumulation at 47 and 59 DAC.

The AA content increased ($p \leq 0.05$) in the first 47 DAC (1.5 mmol mg^{-1} tissue), but decreased ($p \leq 0.05$) during senescence (59 DAC) in the control plants (Figure 3A). In contrast, in leaves sprayed with BAP AA content increased ($p > 0.05$) 47 DAC (2.1 mmol mg^{-1} tissue) and 59 DAC (2.5 mmol mg^{-1} tissue) relative to the control plants (1.5 and 1.2 mmol mg^{-1} tissue). APX activity also increased ($p \leq 0.05$) 47 DAC (27%) and 59 DAC (79.5%) relative to control leaves (Figure 3B). These results coincide with Liu and Huang (2002) and Zavaleta-Mancera *et al.* (2007), who propose that cytokinins activate antioxidant defense and delay oxidative damage during senescence.

The BAP can delay oxidative damage not only by inducing the activity of antioxidant enzymes such as APX, but also by increasing the total AA content. This stimulated APX activity and the antioxidant capacity in tea leaves (*Camellia sinensis*) (Chen and Asada, 1989). Furthermore, in senescent fragments of wheat incubated in darkness, BAP increase CAT and APX activity contrasting with leaves without cytokines (Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007). In the present experiment, data analysis suggests that similar mechanisms of protection against oxidative damage in wheat operate in orchard

- Foyer, C. H., and G. Noctor. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* 28: 1056-1071.
- Gan, S., and R. M. Amasino. 1996. Cytokinins in plant senescence: from spray and pray to clone and play. *Bio Essays* 18: 557-565.
- He, P., M. Osaki, M. Takebe, T. Shinano, and J. Wasaki. 2005. Endogenous hormones and expression of senescence-related genes in different senescent types of maize. *J. Exp. Bot.* 56: 1117-1128.
- Hernández-Garay, A., C. Matthew, and J. Hodgson. 1997. Effect of spring grazing management on perennial ryegrass and ryegrass-white clover pastures. 2. Tiller and growing point densities and population dynamics. *New Zealand J. Agric. Res.* 40: 37-50.
- Hodgson, J., and I. M. Brookes. 1999. Nutrition of grazing animals. In: White, J., and J. Hodgson (eds). *New Zealand Pasture and Crop Science*. Auckland, New Zealand Oxford University Press. 323 p.
- Jacobs, T. W. 1995. Cell cycle control. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 317-319.
- Jiménez, A., J. A. Hernández, L. A. Del Río, and F. Sevilla. 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol.* 114: 275-284.
- Li, Q., J. E. Bettany, I. Donnison, C. M. Griffiths, H. Thomas, and I. M. Scott. 2000. Characterization of a cysteine protease cDNA from *Lolium multiflorum* leaves and its expression during senescence and cytokinin treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 1492:233-236.
- Liu, X., and B. Huang. 2002. Cytokinin effects on creeping bentgrass response to heat stress. II. Leaf senescence and antioxidant metabolism. *Crop Sci.* 42:466-472.
- Neill, S. J., R. Desikan, and J. T. Hancock. 2002. Hydrogen peroxide signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:388-395.
- Mora-Herrera, M. E., y H. López-Delgado. 2006. Tolerancia a baja temperatura inducida por ácido salicílico y peróxido de hidrógeno en microplantas de papa. *Fit. Méx.* 29:81-85.
- Noctor, G., and C. H. Foyer. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:249-279.
- Ookawa, T., Y. Naruoka, A. Sayama, and T. Hirasawa. 2004. Cytokinin effects on ribulose 1-5-biphosphate carboxylase/oxygenase and nitrogen partitioning in rice during ripening. *Crop Sci.* 44: 2107-2115.
- Prochazkova, D., R. K. Sairam, G. C. Srivastava, and D. V. Singh. 2001. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Sci.* 161:765-771.
- SAS Institute Inc. 1995. User's Guide. Statistics. Version 6. Fourth ed. SAS Inc. Cary North America, USA. 956 p.
- Scandalios, J. G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Medical Biol. Res.* 38: 995-1014.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. Third ed. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts. 690 p.
- Velasco-Zebadúa, M. E., A. Hernández-Garay, V. A. González-Hernández, J. Pérez-Pérez, H. Vaquera-Huerta, y S. A. Galvis. 2001. Curva de crecimiento y acumulación estacional del pasto ovinillo (*Dactylis glomerata* L.). *Téc. Pec. Méx.* 39:1-14.
- Warm, E., and G. G. Laties. 1982. Quantification of hydrogen peroxide in plant extracts by the chemiluminescence reaction with luminol. *Phytochem. Anal.* 21: 827-831.
- grass with the effect of BAP: they promote AA accumulation, increase APX activity, and decrease oxidative damage that is characteristic of senescence. This prevents peroxidation of fatty acids in cell membranes that leads to cell death (Scandalios, 2005). H₂O₂ concentrations in orchard grass leaves sprayed with BAP at 47 DAC (30-40% senescence) and 59 DAC (50-60% senescence) surpassed ($p \leq 0.05$) control plants by 52 and 53% (Figure 4). H₂O₂ in high concentrations may be toxic for the plant, but it can also function as a signaling molecule that induces the expression of stress-protection genes (Neill *et al.*, 2002). Thus, the increase in H₂O₂ in orchard grass sprayed with BAP can be associated with signaling of stress-defense genes of senescence, while an increase in protein content and APX activity can be associated with H₂O₂ signaling mechanisms by effect of BAP that led to a delay in cell aging; also, the antioxidant activity of AA and APX can regulate H₂O₂ accumulation in signaling without being lethal to the cell. In potato (*Solanum tuberosum*) an accumulation of H₂O₂ induced tolerance to heat shock. Moreover, H₂O₂ treatments can increase catalase (CAT) activity and survival of potato seedlings at low temperatures by 44 and 92%, depending on the variety (Mora-Herrera and López-Delgado, 2006).

CONCLUSIONS

Application of 6-benzylaminopurine BAP (0.1 mM) delayed leaf senescence in orchard grass; at 17 weeks senescence decreased 28.6%, and PS increased 2.5 times by d 59. BAP also promoted accumulation of ascorbic acid (AA). It is proposed that one of the mechanisms of delaying senescence in orchard grass is through increasing APX and AA antioxidants, which provide greater protection to membranes against damage during leaf senescence. It is then possible to manipulate senescence in a pasture for better use and management, while the increases in proteins and AA could improve its nutritional quality.

—End of the English version—



Zavaleta-Mancera, H. A., H. López-Delgado, H. Loza-Tavera, M. Mora-Herrera, C. Trevilla-García, M. Vargas-Suarez, and H. J. Ougham. 2007. Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *J. Plant Physiol.* 164:1572-1582.