








RESPUESTA AGRONÓMICA Y ESTRUCTURAL DE *PETUNIA × HYBRIDA* (SOLANACEAE) ANTE LA APLICACIÓN DE BRASINOESTEROIDES

Agronomic and structural response of *Petunia × hybrida* (Solanaceae) to the application of brassinosteroids

Alfredo M. Pérez¹, Lucía M. Toffoli², Ana I. Ruiz³, Norma N. Medrano², Sergio M. Salazar^{2,4*} & Patricia L. Albornoz^{3,5*}

Resumen: La floricultura argentina presenta un desafío que incluye el mejoramiento de la producción mediante el uso de compuestos orgánicos. Las fitohormonas, como los brasinoesteroides (BRs), son una alternativa promisoría. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta agronómica y los cambios estructurales en hoja de *Petunia × hybrida* frente a la aplicación de BRs. Plantines de la Serie Dreams® fueron trasplantados en macetas, a los 15 días se efectuó la aplicación de la primera dosis de los BRs EP24 y BB16. La segunda aplicación se realizó a los 20 días. Para el análisis agronómico se evaluó: índice de verdor, biomasa, área foliar y número de flores; para los cambios estructurales: cierre estomático, deposición de calosa y lignina. Los resultados evidenciaron que las plantas tratadas con BB16 y EP24, mostraron mayor producción de biomasa en relación con el testigo absoluto. Las plantas tratadas con EP24 mostraron aumento en el número de flores, menor apertura estomática, y mayor deposición de calosa y lignina en los haces vasculares del nervio principal. Los BRs podrían ser utilizados en el cultivo de *Petunia × hybrida*, como alternativa biotecnológica para mejorar la producción de flores, promoviendo el crecimiento de las plantas y reduciendo el uso de fertilizantes sintéticos.

Palabras clave: Brasinoesteroides, floricultura, *Petunia*.

Summary: The Argentine floriculture presents a challenge that includes the improvement of production through the use of organic compounds. Phytohormones, such as brassinosteroids (BRs), are a promising alternative. The objective of this work was to evaluate the agronomic response and structural changes in *Petunia × hybrida* leaf against the application of BRs. Dreams® Series seedlings were transplanted into pots, after 15 days the application of the first dose of BRs EP24 and BB16 was carried out. The second application was made after 20 days. For the agronomic analysis the following were evaluated: greenness index, biomass, foliar area and number of flowers; for structural changes: stomatal closure, deposition of callose and lignin. Results showed that plants treated with BB16 and EP24 showed higher biomass production in relation to absolute controls. Plants treated with EP24 showed an increase in the number of flowers, less stomatal opening, and greater deposition of callose and lignin in the vascular bundles of the main nerve. BRs could be used in the cultivation of *Petunia × hybrida*, as a biotechnological alternative to improve flower production, promoting plant growth and reducing the use of synthetic fertilizers.

Keywords: Brassinosteroids, floriculture, *Petunia*.

¹ Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT. Ayacucho 471, (T4000JFE) San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

² Estación Experimental Agropecuaria Famaillá, INTA. Ruta Provincial N° 301 Km 32, (T4132) Dpto. Famaillá, Tucumán, Argentina.

³ Instituto de Morfología Vegetal, Fundación M. Lillo. Miguel Lillo 251, (T4000JFE) San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

⁴ Cátedra de Microbiología, Facultad de Agronomía y Zootecnia, UNT. F. Ameghino s/n. B° Mercantil, (T4105) El Manantial. Tucumán, Argentina.

⁵ Cátedra de Anatomía Vegetal, Facultad de Ciencias Naturales e IML, Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205, (T4000JFE) San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

*E-mail: albornoz@csnat.unt.edu.ar, salazar.sergio@inta.gov.ar

Introducción

Petunia Juss. pertenece a la familia Solanaceae, género endémico de América del Sur donde posee alrededor de 11 especies, con centro de diversidad en el sur de Brasil (Stehmann et Semir, 2005). Incluye hierbas perennes o anuales, erectas, postradas o decumbentes. El período de floración ocurre desde la primavera hasta fines de otoño, con flores simples o dobles, con pétalos de bordes ondulados y rectos; habitan en suelos bien drenados y con suficiente humedad, siendo tolerantes a la salinidad (Fries, 1911; Fornes et al., 2007; Stehmann et al., 2009).

En Argentina se encuentran siete especies de *Petunia*, una es endémica (Palchetti et al., 2020).

Petunia axillaris (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb. y *P. integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell., tienen amplia distribución, crecen en el sur de Brasil, Argentina, Uruguay (Wijsman, 1982) y son los taxones parentales del híbrido *P. × hybrida* Hort. ex E. Vilm., conocida vulgarmente como “petunia” o “petunia de jardín”. *Petunia × hybrida* es la especie floral, ornamental, de maceta, más cultivada en el mundo (Hamrick, 2005) debido a su versatilidad, el largo período de floración y la amplia disponibilidad de genotipos con colores y formas muy variadas. Actualmente es un producto en continuo mejoramiento, de gran interés para la floricultura dada la importancia económica que posee en el mercado mundial de plantas ornamentales (Fornes et al., 2007).

La floricultura en Argentina, ha comenzado a tomar importancia en provincias como Formosa, Santa Fe, Tucumán y Mendoza. El valor de la actividad florícola dentro de la economía nacional, no sólo se relaciona con la generación de divisas, sino también con una alta demanda de mano de obra especializada (Hashimoto, 2010). En la producción nacional de plantines anuales herbáceos, *P. × hybrida* es la especie más cultivada para comercialización (Barbaro et al., 2015). Dicho cultivo demanda una elevada aplicación de fertilizantes químicos, los que constituyen elementos básicos e imprescindibles para obtener la mejor

calidad e incrementar el número de flores (Hoda et Mona, 2014). No obstante, se ha comprobado que el uso indiscriminado de insumos de síntesis química implica un costo monetario elevado, además de contaminar el suelo, reducir la biodiversidad, aumentar los riesgos de salinización, disminuir considerablemente las reservas energéticas del suelo y contaminar aguas superficiales y subterráneas (Dierksmeier, 2007). Atendiendo a esta situación se hace necesario evaluar alternativas de fertilización que resulten más económicas a los agricultores y ambientalmente sostenibles (Muñoz et Lucero, 2008). Especial énfasis ha cobrado, desde la década del ochenta, la utilización de fitohormonas, entre ellas los brasinoesteroides (BRs) con reconocidas propiedades para la protección de las plantas y el aumento en la producción agrícola (Seeta et al., 2002; Salgado et al., 2008). El uso de BRs en agricultura, es una alternativa segura que evita o reduce la aplicación de agroquímicos tóxicos, mejorando el desarrollo, rendimiento, calidad y tolerancia de las plantas (Coll et al., 2015). Los BRs son reguladores del crecimiento de las plantas involucrados en una amplia variedad de procesos a nivel celular y molecular. La aplicación de BRs induce un amplio rango de respuestas por parte de las plantas, incluyendo un incremento en la expansión celular de las hojas, aumento en la elongación del tallo, crecimiento del tubo polínico, desenrollamiento de hojas, reorientación de las microfibrillas de celulosa, formación de tejido conductor, en la fotomorfogénesis, en la división celular, estimulación o inhibición de la rizogénesis, inducción de la biosíntesis de etileno, polarización de la membrana y poseen un gran potencial para aumentar el desarrollo y crecimiento floral (Runkova et al., 1999; Hu et al., 2000; Nemhauser et Chory, 2004; Singh et Shono, 2005; Reyes et al., 2008; Hernández Silva et García-Martínez, 2016).

Los brasinoesteroides juegan un papel importante en la tolerancia al estrés biótico y abiótico, tales como la resistencia a enfermedades, tolerancia a la sequía, salinidad, calor, frío, pesticidas y metales

pesados, entre otros (Bajguz et Hayat, 2009; Gomes, 2011; Vriet et al., 2012); no tienen demasiado efecto cuando las condiciones de crecimiento son óptimas. Estudios toxicológicos demuestran que estos compuestos no son genotóxicos, ni ecotóxicos y tampoco antígenotóxicos (Díaz et Fonseca, 1999).

Otra respuesta de las plantas a los BRs, incluye efectos sobre los sistemas de señalización para la defensa contra insectos, hongos, bacterias y virus patógenos (Clouse, 1996; Izquierdo, 2011; Coll et al., 2015; Furio et al., 2019 a). El cierre estomático y la mayor deposición de calosa y lignina en la pared celular, constituyen marcadores bioquímicos de mecanismos de defensa, son barreras físicas contra la penetración de patógenos invasivos (Wuyts et al., 2006; Asselbergh et al., 2007; Ferreira et al., 2007; Galletti et al., 2008; Millet et al., 2010). Estudios en plantas de papa y tabaco han descripto la relación entre BRs y la activación de mecanismos de defensa, evidenciando la disminución de infecciones provocadas por microorganismos patógenos (Khrupach, 1999; Roth et al. 2000; Nakashita et al., 2003). Así mismo, Núñez Vázquez et al. (2014), reconocen que los BRs regulan la expresión de muchos genes que gobiernan varios procesos biológicos, como el cierre estomático.

Los antecedentes relacionados al uso de BRs en floricultura son escasos en comparación con los de horticultura; los que se refieren a gladiolos, tulipanes, orquídeas, claveles y rosas, evidenciando incremento en número de flores y bulbos, y en la longitud y grosor de tallos y botones florales (Runkova et al., 1999; Suarez, 2007; Salgado et al., 2008; Castilla Valdés et González Vega, 2011; Soria Llerena, 2011). En Tucumán se realizaron ensayos con biofertilizantes y bioinsumos aplicados en la producción de plantas ornamentales y hortícolas, obteniéndose resultados alentadores (Salazar et al., 2016; Toffoli et al., 2018; Furio et al., 2019a, b).

A fin de contribuir en el conocimiento y la tecnología para la producción de plantas ornamentales, el objetivo de este trabajo fue

evaluar la respuesta agronómica y estructural en *Petunia × hybrida* ante la aplicación de BRs.

Materiales y Métodos

El ensayo se llevó a cabo en la Estación Experimental Agropecuaria Famaillá del INTA (27°03'S; 65°25'W, 363 m s.n.m.), en la provincia de Tucumán, Argentina, bajo condiciones de invernadero.

Material vegetal y brasinoesteroides

Se utilizaron plantines de *Petunia × hybrida* Serie Dreams® de un mes de edad, proveniente de viveros comerciales de la provincia de Buenos Aires. Los que fueron trasplantados en macetas de 900 ml conteniendo sustrato GrowMix Standard®, el día 20 de abril 2017. Transcurrido 15 días del trasplante se efectuó la aplicación de la primera dosis de los BRs 24-Epibrasinólida (EP24) y un análogo epirostanico derivado de este, denominado Biobras (BB16), mediante aspersión foliar de ambos BRs a una concentración de 0,1 mg/L (3 de mayo). Ambos brasinoesteroides fueron cedidos por el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad de La Habana, Cuba. La segunda aplicación se realizó a los 20 días posteriores al trasplante (23 de mayo). Para las plantas controles se utilizó agua destilada.

Diseño experimental

El ensayo consistió en los siguientes tratamientos: i) plantas tratadas con EP24, ii) plantas tratadas con BB16 y iii) plantas sin tratamiento ni fertilización (testigo absoluto, TA). En todos los tratamientos se utilizaron 10 plantas, cada una corresponde a una unidad experimental.

Los ensayos tuvieron un diseño completamente aleatorizado. Cada tratamiento estuvo constituido por 10 repeticiones para determinar los parámetros destructivos (biomasa y área foliar) y 20 repeticiones para determinar los parámetros no destructivos (índice de verdor y número de flores).

Evaluación de la respuesta agronómica frente a la aplicación de BRs

Se realizó en los distintos períodos fenológicos de la planta (foliación, floración, y senescencia), las variables medidas fueron:

Índice de verdor: se determinó mediante el contenido de clorofila, en tres hojas al azar por individuo/tratamiento, a los 35, 45 y 60 días posteriores al trasplante bajo condiciones de invernadero. Se utilizó el medidor de clorofila SPAD Minolta 502 (Güler et al., 2006).

Biomasa: se determinó el peso fresco y seco de raíz y parte aérea, a los 35 y 60 días posteriores al trasplante, bajo condiciones de invernadero. Se utilizó balanza analítica y estufa de secado con ventilación forzada.

Área foliar: se midió a los 35 y 60 días posteriores al trasplante en invernadero. Se tomaron cinco hojas maduras por cada individuo, las que fueron escaneadas y posteriormente analizadas mediante el uso del Software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), calculándose el área de las mismas. Luego de determinar el área específica de la hoja (AEH) como Ad/Wd , en donde Ad es el área y Wd es el peso

seco de las hojas, se infirió el área foliar como $Af=AEH \times Wb$.

Número de flores: se tomó el dato de primera flor abierta visible en cada maceta de seguimiento. El número de flores se cuantificó semanalmente por individuo/tratamiento, durante 10 semanas (Fig. 1A). Transcurridos los 60 días del inicio del ensayo, se realizó el trasplante bajo condiciones a campo, ubicando las mismas en los bordos a tres bolillos, y se continuó con el conteo de flores bajo condiciones de campo (Fig. 1B).

Evaluación de los cambios estructurales frente a la aplicación de BRs

Se trabajó con 5 individuos, de cada uno se extrajeron 5 hojas tratadas con ambos BRs (EP24 y BB16) y el control (TA). Las muestras foliares se tomaron 30 días posteriores a la segunda aplicación de los BRs, fueron fijadas en FAA (1/1/8 v/v/v formol: ácido acético glacial: etanol 80%) y posteriormente procesadas. Las variables analizadas fueron:

Cierre estomático: las hojas fueron diafanizadas según la técnica de Dizeo de Stritmatter, y posteriormente teñidas



Fig. 1. *Petunia × hybrida*. A: Plantas en invernáculo, a los 30 días del inicio del ensayo. B: Plantas trasplantadas en camellones bajo condiciones de campo a tres bolillos a los 60 días del inicio del ensayo. Escalas: A, 30 µm; B, 15 µm.

con cristal violeta (D’Ambrogio de Argüeso, 1986). Los preparados fueron montados en agua glicerina (1:1). Se tomaron, al azar, microfotografías de 10 campos ópticos (63x), de ambas superficies foliares. Se utilizó la cámara digital (Canon, Power Shot A620, 7.1 M.P.), incorporada al microscopio óptico (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Göttingen, Alemania). Posteriormente, para calcular la apertura estomática se utilizó el software ImageJ versión 1.44 (NIH) (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Deposición de calosa: se realizaron cortes transversales del sector medio de la hoja, los que fueron teñidos con azul de anilina de acuerdo al “Método III” de Martin (1959), con modificaciones propias, donde los cortes fueron tratados con lavandina hasta clarificación, posteriormente lavados y teñidos con azul de anilina al 0,05% en KH₂PO₄ (0,15M) y mantenidos en oscuridad durante 2 horas, y posterior observación con microscopía de epifluorescencia (Olympus BX43, U-TVO 5xc-3, filtro UV 365 nm). Por cada muestra se realizaron cortes seriados de 20 µm a 25 µm de espesor y se distribuyeron al azar en 5 portaobjetos con 10 cortes en cada uno. Cada corte fue examinado y fotografiado. La deposición de calosa se clasificó como débil o brillante.

Deposición de lignina en elementos del xilema: para la detección de lignina se utilizaron dos métodos cualitativos, microscopía de epifluorescencia y prueba específica de floroglucina (D’Ambrogio de Argüeso, 1986). Para microscopía de epifluorescencia se realizaron cortes transversales del sector medio de la hoja mediante la técnica de “mano libre” (D’Ambrogio de Argüeso, 1986), y se tomaron microfotografías de las paredes celulares autofluorescentes.

Para la prueba de floroglucina los cortes transversales del sector medio de la hoja fueron clarificados con lavandina, luego lavados con agua destilada, se aplicó floroglucina al 1% en solución alcohólica y se sometieron a la llama

directa, posteriormente se adicionó ácido clorhídrico al 25% (D’Ambrogio de Argüeso, 1986). Las paredes celulares lignificadas fueron observadas por la intensidad de la coloración rojo violáceo. Las microfotografías fueron tomadas en microscopio óptico (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Göttingen, Alemania) equipado con cámara digital (Canon A620, Power Shot 7,1 M.P.). El número de preparados y cortes analizados fue idéntico a lo mencionado para calosa.

Análisis estadístico

Los datos de las variables índice de verdor, biomasa, área foliar, número de flores y cierre estomático se analizaron con el programa InfoStat (Di Rienzo et al., 2013), y se aplicó el análisis de la varianza seguido de la prueba de Tukey ($\alpha > 0,05$).

Resultados

Respuesta agronómica de las plantas frente a la aplicación de BRs

- Índice de verdor: las plantas tratadas con brasinoesteroides evidenciaron similares valores al control, por lo cual no hubo diferencia significativa entre tratamientos y estadios evaluados (Tabla 1).
- Biomasa: el peso fresco aéreo de las plantas tratadas con BB16, a los 35 días

Tabla 1. Índice de verdor en plantas de *Petunia × hybrida* tratadas con BRs (EP24, BB16). Medias ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($p > 0,05$).

Table 1. Greenness index in *Petunia × hybrida* plants treated with BRs (EP24, BB16). Means ± standard error. Different letters indicate statistically significant differences according to the Tukey test ($p > 0.05$).

Tratamientos	Índice de verdor		
	30 días	45 días	60 días
TA	29,7 ± 0,43 b	32,1 ± 0,39 a	28,4 ± 0,51 a
EP24	29,1 ± 0,43 b	32,2 ± 0,39 a	29,7 ± 0,51 a
BB16	29,1 ± 0,43 b	31,8 ± 0,39 a	28,9 ± 0,51 a

Tabla 2. Biomasa en plantas de *Petunia × hybrida* tratadas con BRs (EP24, BB16). Peso fresco partes aéreas (PFPA); peso fresco raíz (PFR); peso seco partes aéreas (PSPA); peso seco raíz (PSR). Medias ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas según la prueba de Tukey ($p > 0,05$).

Table 2. Biomass in *Petunia × hybrida* plants treated with BRs (EP24, BB16). Fresh weight aerial parts (PFPA); root fresh weight (PFR); dry weight aerial parts (PSPA); root dry weight (PSR). Means ± standard error. Different letters indicate statistical differences according to Tukey’s test ($p > 0.05$).

Tratamientos	PFR		PFPA		PSR		PSPA	
	35 días	60 días	35 días	60 días	35 días	60 días	35 días	60 días
TA	9,6 ± 0,83 a	15,8 ± 1,30 a	21,2 ± 1,28 ab	51,6 ± 6,28 a	0,9 ± 0,49 a	2,3 ± 0,27 b	1,7 ± 0,07 a	3,6 ± 0,40 a
EP24	6,6 ± 0,83 a	20,1 ± 1,30 a	18,6 ± 1,28 b	44,9 ± 6,28 a	0,6 ± 0,49 a	3,4 ± 0,27 a	0,9 ± 0,07 a	3,6 ± 0,40 a
BB16	9,7 ± 0,83 a	17,5 ± 1,30 a	23,6 ± 1,28 a	42,2 ± 6,28 a	1,9 ± 0,49 a	2,7 ± 0,27 ab	1,2 ± 0,07 a	3,8 ± 0,40 a

del trasplante, evidenció un mayor valor, con diferencia significativa en relación al tratamiento con EP24. Mientras que el peso seco de raíz en plantas tratadas con EP24 mostró un mayor valor a los 60 días del trasplante, con diferencia significativa en relación al tratamiento de control (Tabla 2).

- Área foliar: las plantas tratadas con brasinoesteroides evidenciaron similares valores a las plantas controles en todos los periodos analizados, por lo cual no hubo diferencia significativa entre tratamientos (Tabla 3).
- Número de flores: las plantas TA mostraron un mayor número de flores en la segunda semana de floración, con diferencia significativa en relación a los tratamientos

con BRs. En la quinta, sexta y séptima semana (semanas correspondientes a la última en invernadero y las dos primeras a campo) las plantas tratadas con EP24 mostraron mayor número de flores, con diferencia significativa (Tabla 4), respecto a los restantes tratamientos.

Respuesta estructural de las hojas frente a la aplicación de BRs

Cierre estomático: los estomas de la superficie abaxial de las plantas tratadas con EP24 evidenciaron menor cierre estomático, y diferencia estadística respecto del control (Fig. 2).

Deposición de calosa: las deposiciones de calosa en plantas tratadas y plantas controles fueron observadas en las placas cribosas del floema de los haces vasculares de la vena principal. Las plantas controles y las tratadas con BB16 expusieron menor deposición de calosa, demostrada por una débil fluorescencia (Fig. 3A, B); mientras que las plantas a las que se aplicó EP24 presentaron mayor deposición de calosa, evidenciada por placas cribosas más brillantes (Fig. 3C).

Deposición de lignina: la acumulación de lignina en los elementos del xilema en plantas tratadas y plantas controles, fue observada tanto con microscopio de epifluorescencia (Fig. 3A-F) como en microscopio óptico (Fig. 3G-I). En ambos casos, las plantas tratadas con EP24 evidenciaron la mayor deposición de lignina en los vasos del xilema debido a la intensidad de autofluorescencia (Fig. 3F) y de coloración con floroglucina (Fig. 3I).

Tabla 3. Área foliar en plantas de *Petunia × hybrida* tratadas con BRs (EP24, BB16). Medias ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas según la prueba de Tukey ($p > 0,05$).

Table 3. Leaf area in *Petunia × hybrida* plants treated with BRs (EP24, BB16). Means ± standard error. Different letters indicate statistical differences according to Tukey’s test ($p > 0.05$).

Tratamientos	Área Foliar (cm ²)	
	35 días	60 días
TA	784,8 ± 76,18 a	2692,7 ± 436,65 a
EP24	695,6 ± 76,18 a	2622,2 ± 436,65 a
BB16	790,7 ± 76,18 a	2361,1 ± 436,65 a

Tabla 4. Número de flores en plantas *Petunia × hybrida* tratadas con BRs (EP24, BB16), en invernadero y a campo. Medias ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas según la prueba de Tukey ($p > 0,05$).

Table 4. Number of flowers in *Petunia × hybrida* plants treated with BRs (EP24, BB16), in greenhouse and in the field. Means ± standard error. Different letters indicate statistical differences according to Tukey's test ($p > 0.05$).

Tratamientos	Número de flores en invernadero					Número de flores a campo				
	1° semana	2° semana	3° semana	4° semana	5° semana	6° semana	7° semana	8° semana	9° semana	10° semana
TA	0,1 ± 0,07 a	0,6 ± 0,17 a	2,2 ± 0,33 b	3,5 ± 0,42 b	5,4 ± 0,52 b	7,3 ± 0,85 b	8,8 ± 0,94 b	10,6 ± 1,03 b	11,7 ± 1,08 b	13,8 ± 1,17 b
EP24	0,1 ± 0,07 a	0,4 ± 0,14 b	1,8 ± 0,30 b	3,5 ± 0,42 b	6,2 ± 0,56 a	10,2 ± 1,01 a	11,5 ± 1,07 a	13,0 ± 1,14 b	14,4 ± 1,20 b	16,5 ± 1,29 b
BB16	0,1 ± 0,07 a	0,4 ± 0,15 b	2,2 ± 0,33 b	3,3 ± 0,41 b	5,7 ± 0,53 b	8,7 ± 0,93 b	10,0 ± 1,00 b	11,8 ± 1,09 b	13,2 ± 1,15 b	15,6 ± 1,25 b

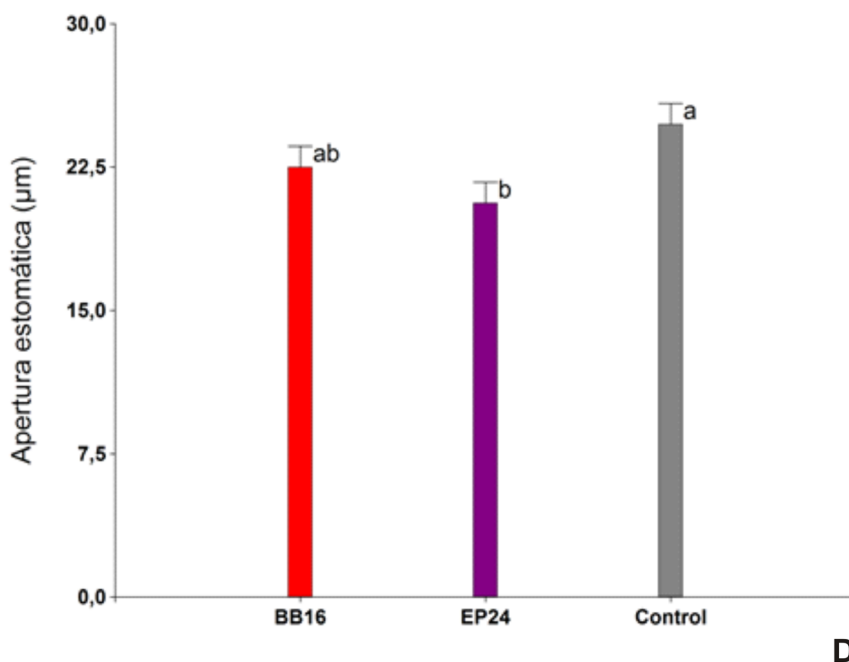
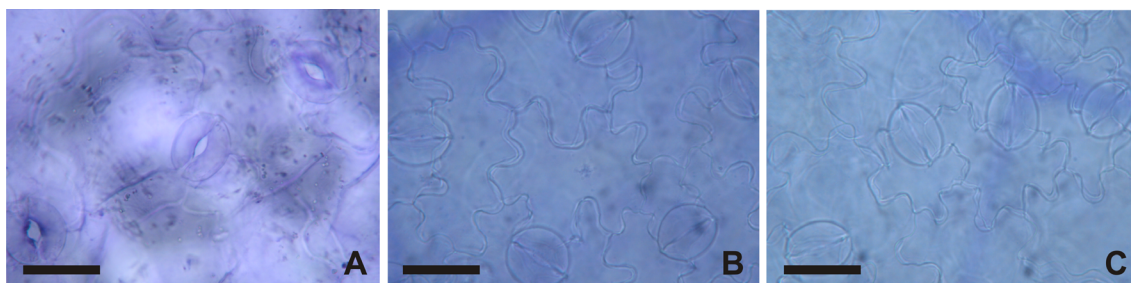


Fig. 2. *Petunia × hybrida* estomas de epidermis foliar abaxial. A: Testigo absoluto (TA). B: Tratamiento con BB16. C: Tratamiento con EP24. D: Gráfico de barras de apertura estomática según tratamientos. Escalas: A-C, 30 µm.

Fig. 2. *Petunia × hybrida* stomata of abaxial leaf epidermis. A: Absolute control (TA). B: Treatment with BB16. C: Treatment with EP24. D: Bar graph of stomatal aperture according to treatments. Scales: A-C, 30 µm.

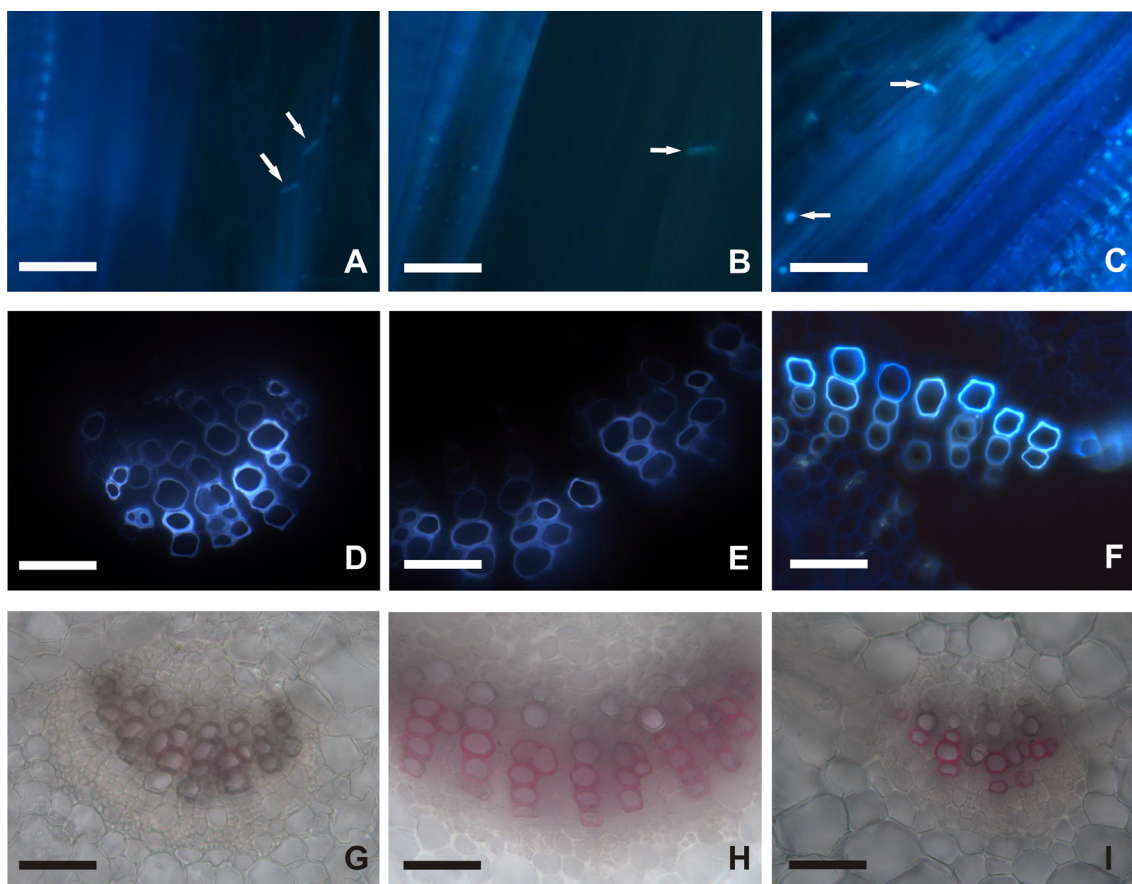


Fig. 3. Deposición de calosa y lignina en los haces vasculares de hojas de *Petunia × hybrida*. Las fotomicrografías ubicadas a la izquierda (A, D y G) corresponden a plantas controles, las del centro (B, E y H) y las de la derecha (C, F e I) a plantas tratadas con BB16 y EP24, respectivamente. A-C: Cortes longitudinales mostrando deposición de calosa en placas de tubos cribosos (flechas). D-I: Cortes transversales del haz vascular central. D-F: Lignina en elementos del xilema, observación con microscopio de epifluorescencia. G-I: Lignina en elementos del xilema, tinción con floroglucina. Escalas: A y B, 15 µm; C, 10 µm; D-G e I, 30 µm; H, 40 µm.

Fig. 3. Callose and lignin deposition in the vascular bundles of *Petunia × hybrida* leaves. The panel on the left corresponds to control plants, the one in the center and the one on the right to plants treated with BB16 and EP24, respectively. A-C: Longitudinal sections showing callose deposition on sieve tube plates (arrows). D-I: Cross sections of the central vascular bundle. D-F: Lignin in xylem elements, observation with epifluorescence microscopy. G-I: Lignin in xylem elements, phloroglucinol staining. Scales: A y B, 15 µm; C, 10 µm; D-G e I, 30 µm; H, 40 µm.

Discusión

La respuesta agronómica y estructural de *Petunia × hybrida* ante la aplicación de brasinoesteroides evidenció resultados diferentes entre los tratamientos. De acuerdo a las variables agronómicas analizadas se observó que las plantas tratadas con BB16 y EP24, mostraron una mayor producción de biomasa en relación al TA, en diferentes etapas

del ensayo. La aplicación de EP24 produjo un aumento tanto de biomasa como en el número de flores y una respuesta positiva en la inmunidad de las plantas evidenciada por deposición de calosa y lignina en los haces vasculares de la vena principal de la hoja; lo que permite interpretar la influencia de estos bioactivos sobre la fotosíntesis y la potencial capacidad de la planta para crecer. Resultados similares en plantas ornamentales, fueron mencionados

por Suárez (2007), quien al incorporar BB16 en orquídeas, observó un incremento en raíces y en el número de pseudobulbos o tallos, además vio favorecida la coloración de las plantas y la calidad de las flores. En este trabajo las plantas de *P. × hybrida* tratadas con EP24, evidenciaron mayor número de flores durante la quinta, sexta y séptima semana. Salgado et al. (2008) observaron emergencia temprana de yemas florales, incremento del número de flores, aumento del número (68%) y masa (85%) de bulbos y yemas bulbíferas en gladiolos y tulipanes, cuyos bulbos fueron embebidos en una solución de epibrasinólida. Khipach et al. (1991) y Rosabal-Ayan et al. (2013) observaron mayores rendimientos en plantas de poroto, arveja y soja tratadas con BB16 y EP24. Ikekawa et Zhao (1991) han informado incrementos en el número de espigas en el cultivo del trigo al que se aplicó EP24.

En cuanto a las respuestas de tipo estructural, en este trabajo las plantas tratadas con EP24 mostraron menor apertura estomática. A diferencia de lo observado por Furio et al. (2019a), quienes informaron que la aplicación de EP24 en plantas de frutilla cv. 'Pájaro', no mostró diferencia en la apertura de estomas, mientras que BB16 causó un notable cierre de los mismos. Existen antecedentes, como el de Choudhary et al. (2012) y Núñez Vázquez et al. (2014), quienes plantean que la interacción entre los BRs y el ácido abscísico (ABA), regula la expresión de genes que gobiernan varios procesos biológicos, entre ellos el cierre estomático.

Las plantas de *P. × hybrida* tratadas con EP24 mostraron una mayor deposición de los polisacáridos calosa y lignina, en las paredes celulares de los haces vasculares de la vena principal de las hojas. Se evidencia entonces una respuesta positiva en la inmunidad de las plantas, actuando la pared celular como barrera física importante ante el ataque de patógenos microbianos. Resultados similares fueron observados por Furio et al. (2019a) en plantas de frutilla cv. 'Pájaro', ante la aplicación del BB16. Dicha diferencia podría estar influenciada por la propia naturaleza, anatomía, fisiología y genética de las plantas, con la consiguiente sensibilidad de las mismas frente al efecto de los BRs.

Conclusión

La aplicación foliar con los BRs EP24 y BB16 en *Petunia × hybrida* produjo cambios agronómicos y estructurales favorables, en relación a las plantas control. Siendo las plantas tratadas con EP24 quienes evidenciaron mayor biomasa, producción de flores y modificaciones estructurales. Esto sugiere que EP24 ejerce un efecto sinérgico en el cultivo de esta planta ornamental en relación con la sanidad, calidad y rendimiento al momento de la producción.

Por lo tanto, los BRs podrían considerarse una alternativa biotecnológica para mejorar la producción de flores, y como biofertilizante en reemplazo de productos de síntesis química (Seeta et al., 2002; Salgado et al., 2008; Coll et al., 2015).

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Fundación Miguel Lillo en el marco del proyecto B-0002-1 (Miguel Lillo 251, T4000JFE, Tucumán) y el INTA a través de los proyectos PNHFA-1106093, 2019-PE-E1-I009-001y 2019-PD-E4-I069-001. Agradecemos a la Fundación Miguel Lillo y a INTA-EEA, Famaillá, Tucumán por el espacio físico y equipamiento necesarios que permitió concretar esta investigación, (Miguel Lillo 251, T4000JFE, Tucumán).

Bibliografía

- ASSELBERGH, B., CURVERS, K., FRANCA, S. C., AUDENAERT, K., VUULSTEKE, M., VAN BREUSEGEM, F. & HOFTE, M. (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiology* 144: 1863-1877. <https://doi.org/10.1104/pp.107.099226>
- BAJGUZ, A. & HAYAT, S. (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.10.002>
- BARBARO, L. A., DELUCCHI, G. & KARLANIAN, M. A. (2015) Producción de plantines de *petunia*

- (*Petunia hybrida*) en sistema flotante. RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias 41: 208-214. ISSN: 0325-8718. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86441580014>
- CASTILLA VALDÉS, Y. & GONZÁLEZ VEGA, M. E. (2011). Efecto de un análogo de brasinoesteroide en la propagación por esquejes de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.) a partir de plantas obtenidas por cultivo de meristemos. Temas de Ciencia y Tecnología 15: 31-36.
- CHOUHDARY, S. P., YU, J. Q., YAMAGUCHI, S. K., SHINOZAKI, K. & PHAN, T. L. S. (2012). Benefits of brassinosteroid crosstalk. Trends Plant Science 17: 594-604. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.012>
- CLOUSE, S. D. (1996). Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development. The Plant Journal 10: 1-8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10010001.x>
- COLL, Y., COLL, F., AMORÓS, A. & PUJOL, M. (2015). Brassinosteroids roles and applications: an up-date. Biología 70: 726-732. <https://doi.org/10.1515/biolog-2015-0085>
- D'AMBROGIO DE ARGÜESO, A. (1986). Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- DÍAZ, S. & FONSECA, G. 1999. Evaluación genotóxica del brasinoesteroide DI-31 (Biobras-16) mediante el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas 18: 27-28.
- DIERKSMEIER, G. (2007). Origen y desarrollo del análisis de residuos de plaguicidas en Cuba. Fitosanidad 11: 87-90.
- DI RIENZO, J. A., CASANOVES, F., BALZARINI, M., GONZÁLEZ, L., TABLADA, M. & ROBLEDÓ, C. (2013). InfoStat versión 2013.
- FERREIRA, I., BAPTISTA, P., VILAS-BOAS, M. & BARROS, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. Food Chemistry 100: 1511-1516. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.043>
- FRIES, R. E. (1911). Die Arten der Gattung *Petunia*. Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar 46: 1-72.
- FORNES, F., BELDA, R. M., CARRIÓN, C., NORIEGA, V., GARCÍA, A. P. & ABAD, M. (2007). Pre-conditioning ornamental plants to drought by means of saline water irrigation as related to salinity tolerance. Scientia Horticulturae 113: 52-59.
- FURIO, R. N., ALBORNOZ, P. L., COLL, Y., MARTINEZ-ZAMORA, G. M., SALAZAR, S. M., MARTOS, G. G. & DÍAZ-RICCI, J. C. (2019a). Effect of natural and synthetic Brassinosteroids on strawberry immune response against *Colletotrichum acutatum*. European Journal Plant Pathology 153: 227-241. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1551-3>
- FURIO, R. N., SALAZAR, S. M., MARTINEZ-ZAMORA, G. M., COLL, Y., HAEL-CONRAD, V. & DÍAZ-RICCI, J. C. (2019b). Brassinosteroids promote growth, fruit quality and protection against *Botrytis* on *Fragaria* × *ananassa*. European Journal Plant Pathology 154: 801-810. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01704-3>
- GALLETI, R., DENOUEX, C., GAMBETTA, S., DEWDNEY, J., AUSUBEL, F. M., DE LORENZO, G. & FERRARI, S. (2008). The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in *Arabidopsis* is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. Plant Physiology 148: 1695-1706. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127845>
- GOMES, M. M. A. (2011). Physiological effects related to brassinosteroid application in plants. En HAYAT, S. & A. AHMAD (eds.), Brassinosteroids: a class of plant hormone, pp.193-242. Springer, Dordrecht, Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-0189-2-7>
- GÜLER, S., MACIT, I., KOÇ, A. & IBRIKCI, H. (2006). Estimating leaf nitrogen of strawberry by using chlorophyll meter reading. Journal of Biological Sciences 6: 1011-1016. <https://doi.org/10.3923/jbs.2006.1011.1016>
- HAMRICK, D. (2005). Ornamental bedding plant industry and plug production. En McDONALD, M. B. & F. Y. KWONG (eds.), Flower seeds: biology and technology, pp. 27-38. Cambridge, EE.UU. <https://doi.org/10.1079/9780851999067.0027>
- HASHIMOTO, P. (2010). Efecto del tipo sustrato de cultivo, la fertilización y el agua de riego en la composición mineral y el desarrollo de *Petunia* × *hybrida* Vilm. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, España. 184 pp.
- HERNÁNDEZ SILVA, E. & GARCÍA-MARTÍNEZ, I. (2016). Brasinoesteroides en la agricultura. II. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 2: 451-462. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i2.357>
- HODA, E. & MONA, S. (2014). Effect of bio and chemical fertilizers on growth and flowering of *Petunia hybrida* plant. American Journal of Plant Physiology 9: 68-77.

- HU, Y., BAO, F. & LI, J. (2000). Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 24: 693-701.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00915.x>
- IKEKAWA, N. & ZHAO, Y. (1991) Application of 24-epibrassinolide in agriculture. En CUTLER, H.G., T. G. YOKOTA & G. ADAM (eds.), *Brassinosteroids. Chemistry, bioactivity, and applications*, pp. 280-291. Washington: American Chemistry Society, Washington, Estados Unidos.
- IZQUIERDO, O. H. (2011). Actividad biológica de los brasinoesteroides y sus análogos en las plantas. *Temas de Ciencia y Tecnología* 15: 45-50.
- KHRIPACH, V. A. (1999). Physiological mode of action of BS. *Cultivos Tropicales* 22: 19-26.
- MARTIN, W. M. (1959). Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* 34: 125-128.
- MILLET, Y. A., DANNA, C. H., CLAY, N. K., SONGNUAN, W., SIMON, M. D., WERCK-REICHHART, D. & AUSUBEL, F. M. (2010). Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns. *Plant Cell* 22: 973-990.
<https://doi.org/10.1105 / tpc.109.069658>
- MUÑOZ, L. A. & LUCERO, A. M. (2008). Efecto de la fertilización orgánica en el cultivo de papa criolla *Solanum phureja*. *Agronomía Colombiana* 26: 340-346.
- NAKASHITA, H., YASUDA, M., HASEGAWA, S., NISHIOKA, M., ARAI, Y. & YAMAGUCHI, I. (2003). Chloroisonicotinamide derivative induces a broad range of disease resistance in rice and tobacco. *Plant Cell Physiology* 43: 823-831.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcf097>
- NEMHAUSER, J. L. & CHORY, J. (2004). Bring it on: new insights into the mechanism of brassinosteroid action. *Journal of Experimental Botany* 55: 265-270.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erh024>
- NÚÑEZ VÁZQUEZ, M., REYES GUERRERO, Y., ROSABAL AYÁN, L. & MARTÍNEZ GONZÁLEZ, L. (2014). Análogos espirostánicos de brasinoesteroides y sus potencialidades de uso en la agricultura. *Cultivos Tropicales* 35: 34-42.
- PALCHETTI, M., CANTERO, J. & BARBOZA, G. (2020). Solanaceae diversity in South America and its distribution in Argentina. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 92: 1-17.
<https://doi.org/10.1590/0001-37652020190017>
- REYES, Y., MAZORRA, L. M. & NÚÑEZ, M. (2008). Aspectos fisiológicos y bioquímicos de la tolerancia del arroz al estrés salino y su relación con los brasinoesteroides. *Cultivos Tropicales* 29: 67-75.
- ROSABAL-AYAN, L., MARTINEZ-GONZÁLEZ, L., REYES-GERRERO, Y. & NUÑEZ-VÁZQUEZ, M. (2013). Resultados preliminares del efecto de la aplicación de Biobras-41 16 en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales* 34: 71-75.
- ROTH, U., FRIEBE, A. & SCHNABL, H. (2000). Resistance inductive in plants by a brassinosteroid-containing extract of *Lychnis viscaria* L. *Zeitschrift für Naturforschung* 55: 552-559.
- RUNKOVA, L. V., ALEXANDROVA, V. S. & BELYAEVA, G. E. (1999). The action of epin on taking roots of perspective varieties of roses. En SHEVELUCHA, V. S., G. I. KARLOV, N. P. KARSUNKINA, E. I. SALNIKOVA, I. V. SKOROBOGATOVA & A. G. SIUSHEVA (eds.), *Regulators of plant growth and development*, 5, pp. 245-246. Moscow Agricultural Academy.
- SALAZAR, S. M., COLL, Y., VIEJOBUENO, J. & COLL, F. (2016). Response of strawberry plants to the application of brassinosteroid under field conditions. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 36: 37-41.
- SALGADO, R., CORTÉS, M. A. & DEL RÍO, R. E. (2008). Uso de brasinoesteroides y sus análogos en la agricultura. *Biológicas* 10: 18-27.
- SEETA, S., VIDYA, B., SUJATHA, E. & ANURADHA, S. (2002). Brassinosteroids- a new class of phytohormones. *Current Science* 10: 1239-1245.
- SINGH, I. & SHONO, M. (2005). Physiological and molecular effects of 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, on thermotolerance of tomato. *Plant Growth Regulation* 47: 111-119.
<https://doi.org/10.1007/s10725-005-3252-0>
- STEHMANN, J. R. & SEMIR J. (2005). New species of *Calibrachoa* and *Petunia* (Solanaceae) from subtropical South America. En KEATING, R. C., V. HOLLOWEL & T. B. CROAT (eds.), *A Festschrift for Willian G. D'arcy: the legacy of a taxonomist. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 104: 341-348. St. Louis, USA.
- STEHMANN, J. R., LORENZ-LEMKE, A. P., FREITAS, L. B. & SEMIR, J. (2009). The genus *Petunia*. En GERATS, T. & J. STROMMER (eds.), *Petunia. Evolutionary, developmental and Physiological genetics*, pp. 1-28. Springer, New York.
- SORIA LLERENA, N. G. (2011). Evaluación de brasinoesteroides en el cultivo del rosal (*Rosa* spp.) var. freedom en el canton de Patate, Provincia del Tungurahua. Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ingeniería Agronómica,

- Ambato, Ecuador. 114 pp. <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/884>
- SUÁREZ, L. (2007). Efecto que ejercen las aspersiones foliares de una mezcla de oligogalacturónidos (Pectimorf) y la formulación a base de un análogo de brasinoesteroides (Biobras-16) en dos especies de orquídeas (*Cattleya leuddemanniana* y *Guarianthe skinneri*). *Cultivos Tropicales* 28: 87-91.
- TOFFOLI, L. M., ALBORNOZ, P. L., MARTÍNEZ ZAMORA, M. G., MEDRANO, N. N. & SALAZAR, S. M. (2018). Modificaciones estructurales en hojas de *Petunia* inoculadas con *Azospirillum brasilense*. XXXV Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán, Tafi del Valle, Tucumán, 25 al 26 de octubre de 2018, p. 19.
- VRIET, C., RUSSINOVA, E. & REUZEAU, C. (2012). Boosting crop yields with plant steroids. *The Plant Cell* 24: 842-857. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.094912>
- WILSMAN, H. J. W. (1982). On the interrelationships of certain species of *Petunia*. 1. Taxonomic notes on the parental species of *Petunia hybrida*. *Acta Botánica Neerlandica* 31: 477-490. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1982.tb01663.x>
- WUYTS, N., MAUNG, Z., SWENNEN R. & DE WAELE D. (2006). Banana rhizodeposition: Characterization of root border cell production and effects on chemotaxis and motility of the parasitic nematode *Radopholus similis*. *Plant and Soil* 258: 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-0013-4>