

CYTOKININ, GIBBERELIC ACID AND DEFOLIATION ON DENSITY AND MORPHOLOGY OF TRICHOME OF *Pelargonium graveolens* L'Her FOR ESSENTIAL OIL BIOSYNTHESIS

CITOQUININA, ÁCIDO GIBERÉLICO Y DEFOLIACIÓN SOBRE DENSIDAD Y MORFOLOGÍA DE TRICOMAS DE *Pelargonium graveolens* L'Her PARA BIOSÍNTESIS DE ACEITE ESENCIAL

Zenzile Peter **Khetsha**¹, Moosa Mahmood **Sedibe**¹, Rudolph Johannes **Pretorius**¹, Elmarie **van der Watt**²

¹Central University of Technology, Free State. Department of Agriculture, 20 President Brand Street, Bloemfontein. South Africa. 9300. (zkhetsha@cut.ac.za). ²University of the Free State. Department of Soil, Crop and Climate Sciences, 205 Nelson Mandela Dr, Bloemfontein. South Africa. 9300.

ABSTRACT

The density and morphology of glandular trichomes in rose geranium (*Pelargonium graveolens* L'Her.) are often correlated to the essential oil biosynthesis. However, whether the different organs in the same rose geranium plant are affected by hail damage, or if they recover similarly following hail damage is still unknown concerning the essential oil biosynthesis. The objective of this study was to evaluate the effects of split-applying cytokinin (CK), gibberellic acid (GA) and defoliation on rose geranium trichome morphology and density, and essential oil biosynthesis. The experiment was carried out in a hail-net covered tunnel structure during 2017-2018 growing season. The experimental design was a complete randomized blocks with a 3x3 factorial arrangement of treatments: three defoliation levels (0, 50, and 100%), two levels of split-application of CK and GA (0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA; and 0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA), and a control. The attenuate, peltate, and capitate trichome groups were identified in the leaf. Morphologically, the attenuate trichome group was less dense on both recovered and new plant leaves, despite split-applied CK and GA treatment. With the peltate group, brevicollate trichome density declined in all plant leaves treated with 0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA on both leaf surfaces. Application of 0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA led to high density of the elongated-capitate type on leaves recovered from 50 and 100% defoliation. The essential oil yield was not affected by density and morphological changes of the trichomes. However, the application of 0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA increased the citronellol content where plants endured 100%

RESUMEN

La densidad y morfología de los tricomas glandulares en el geranio rosa (*Pelargonium graveolens* L'Her.) se correlacionan a menudo con la biosíntesis del aceite esencial. Sin embargo, aún se desconoce si órganos distintos de la misma planta de geranio rosa se ven afectados por el daño del granizo o si se recuperan de manera similar después del daño del granizo en relación con la biosíntesis del aceite esencial. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de citoquinina (CK) y ácido giberélico (GA) en soluciones de aplicación por separado, más la defoliación sobre morfología y densidad del tricoma del geranio rosa, y biosíntesis del aceite esencial. El experimento se llevó a cabo en una estructura de tipo túnel cubierta con una red para granizo durante la temporada de crecimiento 2017-2018. El diseño experimental fueron bloques completo al azar con un arreglo factorial de tratamientos 3x3: tres niveles de defoliación (0, 50 y 100%) y dos niveles de aplicaciones separadas de CK y GA (0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA; y 0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA) y un control. Grupos de tricomas atenuados, peltados y capitados se identificaron en la hoja. Respecto a morfología, el grupo de tricomas atenuados fue menos denso, tanto en las hojas de plantas recuperadas como en las nuevas a pesar del tratamiento de aplicaciones por separado con CK y GA. Con el grupo peltado, la densidad de tricomas brevicollados disminuyó en todas las hojas de las plantas tratadas con 0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA en ambas superficies de las hojas. La aplicación de 0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA condujo a una densidad alta del tipo de capitado alargado en hojas recuperadas de 50 y 100% de defoliación. El rendimiento del aceite esencial no se vio afectado por la densidad y los cambios morfológicos de los tricomas. Sin embargo, la aplicación de 0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA aumentó el contenido de citronelol cuando las plantas toleraron un 100% de defoliación. Los resultados demostraron que los efectos del estrés causado por

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6133-9938>.

Received: April, 2020. Approved: May, 2021.

Published in *Agrociencia* 55: 331-346. 2021.

defoliation. Results demonstrated that the effects of hail damage stress and subsequent split-applied CK and GA could transform the morphology of trichomes, subsequently increasing the density.

Key words: Rose geranium, *Pelargonium graveolens*, hail damage, trichome, citronellol content, split-applying phytohormones.

INTRODUCTION

The environment and its changes can influence the biochemical pathways, the physiological processes that alter plant metabolism and also the glandular trichome development, and, therefore, the essential oil biosynthesis (Gâlea *et al.*, 2017; Parađiković *et al.*, 2019). Hail damage is one of the environmental stress factors which can affect the accumulation of rose geranium (*Pelargonium graveolens* L'Her.) essential oil yield and biosynthesis through defoliation (Yue *et al.*, 2019). However, whether the different organs in the same rose geranium plant recover similarly from hail damage concerning the essential oil biosynthesis is still unknown.

The recovery response mechanism of plants to hail damage, defoliation, wounding or grafting is complex, starting from upregulation of plant-stress hormones at the wound site, and later plant growth regulators to recover the lost organs (Ikeuchi *et al.*, 2017; Nanda and Melnyk, 2018). Therefore, the recovery of leaves following hail damage stress or related climate change affect the essential oil biosynthesis through the specialised structures called glandular trichomes, located on both surfaces of the leaf, and on tender stems and buds (Wang *et al.*, 2019). Rose geranium leaves are essential because of higher trichome density compared to other plant organs; thus, wounding or leaf defoliation might significantly affect the essential oil yield (Sedibe *et al.*, 2013).

Oosthuizen and Coetzee (1984) claimed that the densification of trichomes occurs as early as during leaf differentiation and continues throughout leaf development of *Pelargonium scabrum*; thus, directly affecting the essential oil yield and content. Since leaves of rose geranium are exhaustively exploited by the global perfumery, food and medicinal industries, knowledge on the recovery of essential oil yield and changes in essential oil quality to hail damage

el granizo, seguida de soluciones con CK y GA aplicadas por separado podrían transformar la morfología de los tricomas, y en consecuencia, incrementar la densidad.

Palabras clave: geranio rosa, *Pelargonium graveolens*, daño por granizo, tricoma, contenido de citronelol, fitohormonas en aplicación por separado.

INTRODUCCIÓN

El ambiente y sus cambios pueden influir en las vías bioquímicas, los procesos fisiológicos que alteran el metabolismo de las plantas y también el desarrollo del tricoma glandular y, por lo tanto, la biosíntesis de aceite esencial (Gâlea *et al.*, 2017; Parađiković *et al.*, 2019). El daño por granizo es uno de los factores de estrés ambiental que puede afectar el rendimiento del aceite esencial acumulado del geranio rosa (*Pelargonium graveolens* L'Her.) y su biosíntesis a través de la defoliación (Yue *et al.*, 2019). Sin embargo, aún se desconoce si órganos diferentes de la misma planta de geranio rosa se recuperan de manera similar del daño del granizo respecto a la biosíntesis del aceite esencial.

El mecanismo de recuperación de las plantas como respuesta al daño por granizo, defoliación, heridas o injertos es complejo. Este inicia por regular al alza las hormonas del estrés en el sitio de la herida, y luego los reguladores del crecimiento para recuperar los órganos perdidos de las plantas (Ikeuchi *et al.*, 2017; Nanda y Melnyk, 2018). Por lo tanto, la recuperación de las hojas después de daños por granizo u otros relacionados con el cambio climático, afecta la biosíntesis del aceite esencial a través de estructuras especializadas llamadas tricomas glandulares, ubicadas en ambas superficies de la hoja, en yemas y en tallos jóvenes (Wang *et al.*, 2019). Las hojas del geranio rosa son esenciales debido a su densidad de tricomas mayor en comparación con otros órganos de plantas. Por lo tanto, las heridas o la defoliación podrían afectar significativamente el rendimiento del aceite esencial (Sedibe *et al.*, 2013).

Oosthuizen y Coetzee (1984) afirmaron que la densificación de los tricomas ocurre tan pronto como se da la diferenciación foliar y continúa durante todo el desarrollo foliar de *Pelargonium scabrum*; lo cual afecta directamente el rendimiento y el contenido del aceite esencial. Dado que las hojas de geranio rosa se cosechan de manera exhaustiva para las industrias

followed by phytohormones can be important to growers and the aforementioned industries.

Cytokinin (CK) and gibberellins (GA) are some of the primary phytohormones released by plants to regulate plant recovery processes after defoliation or wounding stress (Jiao, 2016). CK is a plant growth regulator, which primarily occurs as free compounds, glucosides, or as ribosides in the plant root system, particularly in the root apex (Koprna *et al.* 2016). High CK concentrations occur during early shoot initiation, and controls meristem activity (Egamberdieva *et al.*, 2017). GA is also a plant growth regulator; it is biosynthesised in shoot apices and young leaves, acting at a later stage of plant growth and development to regulate plant cell division and shoot elongation (Sharma *et al.* 2018).

Several studies have revealed a reciprocal developmental dependence between the two hormones, where the ratio between GA and CK affects the developmental processes of the plant (Cato *et al.*, 2013; Koprna *et al.*, 2016). High CK and low GA signals are required for normal shoot apical meristem functioning (Sakamoto *et al.* 2001). On the other hand, Nanda and Melnyk (2018) observed that split-applying CK and GA directly affect the interplay between naturally activated CK and GA signals, which determines the recovery response mechanisms of the plant following wounding and defoliation.

Jiao (2016) also reported that *TEMPRANILLO* (*TEM*) 1 and 2 genes regulated signalling of CK and GA, directly affecting the trichome formation in the epidermis; however, this occurs at different times, and sequence. According to Barnes (2013), split-applying CK and GA on plants following hail damage, mechanical cutting back, and severe browsing may cause alterations on morphological features, such as increased trichome density, extensive shoot proliferation, extra-large leaves or elongated stems, and this could directly affect the essential oil yield and composition.

Therefore, the objective of this study was to evaluate the response of rose geranium leaf trichome morphology and density, and the essential oil biosynthesis to defoliation and subsequent split-application of CK and GA. The hypothesis was that the application of a high concentration of split-applied CK and GA would increase the density of the trichomes and subsequently affect the essential oil biosynthesis.

alimentaria, de medicina y perfumería a nivel mundial, el conocimiento sobre la recuperación del rendimiento del aceite esencial y los cambios en su calidad debido al daño causado por el granizo seguido de fitohormonas resulta importante para productores y para las industrias mencionadas.

Las citoquininas (CK) y las giberelinas (GA) son algunas de las fitohormonas primarias liberadas por las plantas para regular los procesos de recuperación después de defoliación o estrés causado por heridas (Jiao, 2016). Las CK son reguladores del crecimiento vegetal que se presentan principalmente como compuestos libres, glucósidos o ribósidos en el sistema radical de las plantas, particularmente en el ápice de las raíces (Koprna *et al.*, 2016). Las concentraciones de CK altas ocurren durante el inicio temprano de las yemas y controlan la actividad meristemática (Egamberdieva *et al.*, 2017). GA también es un regulador del crecimiento de las plantas; se biosintetiza en los ápices de las yemas y las hojas jóvenes, actúan en una etapa posterior del crecimiento y desarrollo de las plantas para regular su división celular y el alargamiento de brotes aéreos (Sharma *et al.*, 2018).

Algunos estudios han mostrado una dependencia recíproca del desarrollo entre las dos hormonas. La relación entre GA y CK afecta los procesos del desarrollo vegetal (Cato *et al.*, 2013; Koprna *et al.*, 2016). Señales de CK altas y de GA bajas se requieren para el funcionamiento normal del meristemo apical (Sakamoto *et al.*, 2001). Por otro lado, Nanda y Melnyk (2018) observaron que la aplicación por separado de CK y GA afecta directamente la interacción entre las señales de CK y GA activadas en forma natural; esto determina los mecanismos de respuesta para la recuperación de la planta después de heridas y defoliación.

Jiao (2016) también informó que los genes *TEMPRANILLO* (*TEM*) 1 y 2 regulaban la señalización de CK y GA y afectaban directamente la formación de tricomas en la epidermis; sin embargo, esto ocurría en momentos y secuencias diferentes. De acuerdo con Barnes (2013), la aplicación por separado de combinaciones de CK y GA en plantas después de daños causados por granizo, corte mecánico y pérdida de ramas severa puede causar alteraciones en las características morfológicas, como un aumento en la densidad de tricomas, amplia proliferación de brotes, hojas extragrandes o tallos alargados; y esto podría afectar en forma directa el rendimiento y la composición del aceite esencial.

MATERIALS AND METHODS

The experimental site was located at Thitapoho farm (28° 56' S; 26° 19' E, 1307 m), situated in the Free State Province of the Republic of South Africa (RSA). This experiment was conducted in a 120 m² tunnel structure, covered with a 30% Knittex® hail net (RSA) during the 2017-2018 growing season.

Plant material and agronomic practices

Rooted rose geranium ('North Africa type') cuttings (\pm 10 cm high) were obtained from the Agricultural Research Council (Pretoria, RSA) and transplanted on September 1, 2017. Morphologically, the soil at this site is classified as a Klapmuts soil form consisting of a clay loam. Recycled tyres were used to construct elevated planting beds, each measuring 20 x 1200 x 150 cm (h x l x w). Planting beds were fertilized with 100 kg ha⁻¹ of 2:3:2 (26) NPK before transplanting. A green DPC plastic sheet (Archies Hardware, RSA) was used as mulch to suppress weed germination and to prevent possible soil contamination with the solutions. Plants were irrigated three times per week for 2 h at a time (12 mm water per plant) using a Netafim (RSA) dripper lines (300 mm spacing and a 2 L h⁻¹ delivery rate).

Experimental design and treatments

The experiment was a 3x3 factorial, arranged in a complete randomized blocks design with three replications. Treatments were three hail damage simulation levels (0, 50, and 100% manual defoliation); two levels of split-applied CK and GA (0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA; 0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA) and control with distilled water, applied following the simulated defoliation treatments. Each (1 m²) experimental plot contained six plants. The row spacing was 50 cm, and 30 cm between plants.

Hail damage simulations (by manual defoliation) were executed at 14:00 on 29 December 2017, 116 d following the transplanting of the rooted cuttings. Hail was mechanically simulated according to the recommendations of the hail insurance on vegetables and commercial crops by defoliation and decapitation of all terminal buds with a pair of garden secateurs as described by Irigoyen *et al.* (2010). Fifty per cent hail damage simulation was achieved by defoliating the top half (average plant height per experimental unit) of each experimental plant. The 100% hail damage simulation treatment was achieved by total removal of rose geranium leaves. After defoliation treatments, removal of the terminal buds of stems and random bruising of the main stem and lateral branches followed, using a pair of hand secateurs at the same date. Following the hail simulation, plants

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta de la morfología y densidad del tricoma de la hoja del geranio rosa y la biosíntesis del aceite esencial, a la defoliación seguida de aplicación por separado de soluciones combinadas de CK y GA. La hipótesis fue que la aplicación por separado de soluciones con concentraciones altas de CK y GA aumentaría la densidad de los tricomas y en consecuencia afectaría la biosíntesis del aceite esencial.

MATERIALES Y MÉTODOS

El sitio experimental estuvo ubicado en la finca Thitapoho (28° 56' S; 26° 19' E, 1307 m), situado en la provincia Free State de la República de Sudáfrica (RSA). Este experimento se llevó a cabo en una estructura de túnel de 120 m², cubierto con una red antigranizo Knittex® (RSA), apertura 30%, durante el ciclo de cultivo 2017-2018.

Materia vegetal y prácticas agronómicas

Esquejes de geranio rosa enraizado ('tipo del norte de África', \pm 10 cm de altura) se obtuvieron del Consejo de Investigación Agrícola (Pretoria, RSA) y se trasplantaron el 1 de septiembre de 2017. En su morfología, el suelo de este sitio está clasificado como una forma de suelo Klapmuts, que consiste en una margarcillosa. Neumáticos reciclados se utilizaron para construir camas de plantación elevadas, cada una de 20 x 1200 x 150 cm (alto x largo x ancho). Las camas de siembra se fertilizaron con 100 kg ha⁻¹ de NPK 2:3:2 (26) antes del trasplante. Una hoja de plástico DPC verde (Archies Hardware, RSA) se usó como mantillo para suprimir la germinación de malezas y evitar una posible contaminación del suelo con las soluciones. Las plantas se regaron tres veces por semana durante 2 h cada vez (12 mm de agua por planta) con líneas de goteros Netafim (RSA) (300 mm de espaciado y tasa de suministro de 2 L h⁻¹).

Diseño experimental y tratamientos

El experimento fue un factorial de 3x3, organizado en un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. Los tratamientos fueron tres niveles de simulación de daños por granizo (0, 50 y 100% de defoliación manual); dos niveles de aplicación por separado de soluciones con CK y GA (0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA; 0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA); y el control con agua destilada, aplicados después de los tratamientos de defoliación simulada. Cada parcela experimental (1 m²) contenía seis plantas. El espacio entre hileras fue de 50 cm y 30 cm entre plantas.

were treated with 50 mL of split-applied CK and GA from 18 to 21 January 2018.

All reagents, CK and GA were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). The application of CK and GA was split-applied within this period. CK treatment was applied first for 7 d (8 - 14 January 2018, at 6:00 am) and followed by GA on 14 to 21 January 2018, also for 7 d at 6:00 am. CK treatment solutions were prepared by diluting 323 and 646 μL of the stock solution into 1 L distilled water to obtain 0.32 and 0.64 mg L^{-1} , respectively. GA treatment solutions were prepared by diluting 150, and 300 μL of the stock solution into 1 L distilled water to obtain 150 and 300 mg L^{-1} concentrations, respectively. Triton x100 at 0.1% (v/v) was added to the stock solution as a wetting agent. The same irrigation procedure was repeated at the control treatment, but the CK and GA solutions were omitted.

Data collection

Seventy-five days after the phytohormonal treatments, pieces of leaf samples (1 cm^2) were collected from the eighth middle-most leaf (from the bottom) to examine the trichome morphology and density per cm^2 , following methods described by Sedibe *et al.* (2013). Data was collected on a cloudless day, between 10:00 am and 11:00 am. The samples were examined using a Shimadzu SSX-550 (Kyoto, Japan) scanning electron microscope set at 400X μm magnification. Morphology and density of trichome groups were characterised and counted from digital photos obtained from a computer connected to the scanning electron microscope, by opening the saved photo files in Photoshop 7 Savvy (Sybex San Francisco, USA).

Rose geranium essential oil was extracted from three mature plants using a custom-built steam distillation unit at 98 °C for 1 h. The extracted essential oil was analysed using gas chromatography (GC) (Agilent 7890B), equipped with a 30 x 0.25 mm x 0.25 μm column (Agilent 19091S 433 UI, HP5-MS UI) and a mass selective detector (Agilent 5977A). The oven temperature program was maintained at 60 °C for 10 minutes (min). The temperature was increased to 100 °C at a rate of 2°C per min, and then to 145 °C at a rate of 1 °C per min. Finally, the temperature was increased to 300 °C at a rate of 20 °C per min and then run for 2 min. Helium was used as carrier gas at a constant flow of 0.67 mL per min.

Spectra were obtained by electron impact at 70 eV, scanning from 35 m/z to 550 m/z. The peak areas of the selected GC constituents were individually expressed as percentages of all the Total Ion Chromatogram (TIC) peak areas, as determined by mass spectrometry detection (MSD at 250 °C) without using correction factors. The compounds were identified using the NIST11 mass spectral library. The extracted essential oil was

Las simulaciones de daños por granizo por medio de defoliaciones manuales iniciaron a las 14:00 h del 29 de diciembre de 2017, 116 d después del trasplante de los esquejes enraizados. El granizo se simuló mecánicamente de acuerdo con las recomendaciones del seguro contra granizo en hortalizas y cultivos comerciales mediante la defoliación y decapitación de todas las yemas foliares terminales, con tijeras de podar de jardín, como lo describen Irigoyen *et al.* (2010). Una simulación del 50% de los daños causados por el granizo se obtuvo por medio de defoliación de la mitad superior (altura promedio de la planta por unidad experimental) de cada planta experimental. El tratamiento de simulación de daños por granizo al 100% se logró con la eliminación total de las hojas de geranio rosa. Luego de los tratamientos de defoliación, se procedió a la extracción de los brotes terminales de los tallos y a la rotura aleatoria del tallo principal y las ramas laterales, con un par de tijeras de podar manuales en la misma fecha. Después de la simulación de daño por granizo, las plantas se trataron con aplicaciones separadas de 50 mL de las soluciones de CK y GA, del 18 al 21 de enero de 2018.

Todos los reactivos CK y GA se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU.). La aplicación de CK y GA fue por separado dentro de este período. El tratamiento con CK se aplicó primero durante 7 días (8 - 14 de enero de 2018, a las 6:00 am), seguido de GA del 14 al 21 de enero de 2018, también durante 7 d a las 6:00 am. Las soluciones de tratamiento de CK se prepararon diluyendo respectivamente 323 y 646 μL de la solución madre en 1 L de agua destilada para obtener 0.32 y 0.64 mg L^{-1} . Las soluciones de tratamiento de GA se prepararon diluyendo 150 y 300 μL de la solución madre en 1 L de agua destilada para obtener concentraciones de 150 y 300 mg L^{-1} , respectivamente. Como agente humectante se agregó Triton x100 al 0.1% (v/v) a la solución madre. El mismo procedimiento de riego se efectuó en el tratamiento control, pero se omitieron las soluciones de CK y GA.

Recopilación de datos

Setenta y cinco días después de los tratamientos con fitoreguladores se recolectaron trozos de muestras de hojas (1 cm^2) de la octava hoja ubicada más al medio (desde la parte inferior) para examinar la morfología y densidad de tricomas por cm^2 , siguiendo los métodos descritos por Sedibe *et al.* (2013). Los datos se registraron en un día despejado, entre las 10:00 am y las 11:00 am. Las muestras se examinaron con un microscopio electrónico de barrido Shimadzu SSX-550 (Kyoto, Japón), con un aumento en micrómetros (μm) de 400X. La morfología y densidad de los grupos de tricomas se caracterizaron y contaron a partir de fotografías digitales obtenidas de una computadora conectada al microscopio electrónico de barrido, los archivos de microfotografías

quantified using an Agilent 7890B gas chromatograph, and the characterisation of rose geranium ('North Africa type') essential oil quality variables followed the ISO 47312012 [E] standard.

For commercial purpose, only six compounds are determined: linalool, citronellol, geraniol, citronellyl formate, geranyl formate, and guaia-6,9-diene. The relative proportion of these compounds determines the odour quality of the oil. However, the citronellol: geraniol (C:G ratio) is used by the perfumery industry to determine the oil quality. Oil mass (yield) was determined by weighing the oil volume using a PGL 2002 Adam scale (USA) immediately following extraction.

All variables were statistically analysed and compared using PROC GLIMMIX, SAS version 9.4 (PROC GLIMMIX, SAS Institute Inc., 2013). Treatments were compared with Tukey test ($p \geq 0.05$). The Shapiro-Wilks test was performed to test for any deviations of data from the normal distribution.

RESULTS AND DISCUSSION

Leaf samples were collected from recovered rose geranium to study the density and morphology of the trichome relationship with the essential oil biosynthesis following treatment with split-applied CK and GA. Regardless of any split-applied CK and GA after defoliation, two groups of trichomes were observed on the rose geranium leaves. One group consisted of one type of non-glandular trichome, which is regarded as an attenuated kind (Figure 1A). The attenuated trichome is characterised by the long and gradual taper (Payne, 1978).

The second group consisted of three types of glandular trichomes, of which one type belonged to the peltate kind. The peltate kind was characterised by a short neck with bigger round tips and regarded as the brevicollate trichome (Figure 1B) (Payne, 1978). The other two types belong to the capitate kind. One capitate kind consisted of a smaller trichome type, characterised by a short segmented capitate with a columnar hatchet-shaped tip that has a slightly bent apical cell pointing at the leaf apex, known as the asciiform trichome type (Figure 1C) (Payne, 1978). The second capitate kind consisted of elongated segment flask-shaped bodies that incorporated a round head, having similar characteristics as the asciiform and was regarded as the elongated-capitate type (Figure 1D).

Variation in trichome types may play a different role in plant physiology and ecology with variable morphological, mechanical and phytochemical

se guardaron en formato de archivos Photoshop 7 Savvy (Sybex San Francisco, EE.UU.).

El aceite esencial de geranio rosa se extrajo de tres plantas maduras con el uso de una unidad de destilación de vapor hecha a medida, a 98 °C durante 1 h. El aceite esencial extraído se analizó por cromatografía de gases (GC) (Agilent 7890B), equipada con una columna de 30 x 0.25 mm x 0.25 μ m (Agilent 19091S 433 UI, HP5-MS UI) y un detector selectivo de masas (Agilent 5977A). El programa de temperatura del horno se mantuvo a 60 °C durante 10 minutos. La temperatura se aumentó a 100 °C en tasa de incremento de 2 °C por minuto, y luego a 145 °C a una tasa de 1 °C por minuto. Por último, la temperatura se incrementó a 300 °C a una tasa de 20 °C por minuto que se mantuvo durante 2 min; se utilizó helio como gas portador a un flujo constante de 0.67 mL por minuto.

Los espectros lumínicos se obtuvieron por el impacto de electrones a 70 eV, con barridos desde 35 m/z hasta 550 m/z. Las áreas de los picos de los constituyentes GC seleccionados se expresaron como porcentajes individuales de los picos de las áreas del Cromatograma Total de Iones (TIC), según lo determinado por la detección por espectrometría de masas (MSD a 250 °C) sin utilizar factores de corrección. Los compuestos se identificaron al usar la biblioteca espectral de masas NIST11. El aceite esencial extraído se cuantificó con un cromatógrafo de gases Agilent 7890B, y la caracterización de las variables de calidad del aceite esencial de geranio rosa (tipo "Norte de África") siguió la norma ISO 47312012 [E].

Para usos comerciales solo se determinan seis compuestos: linalol, citronelol, geraniol, formiato de citronelilo, formiato de geraniol y guaya-6,9-dieno. La proporción relativa de estos compuestos determina la calidad del aroma del aceite. Sin embargo, la industria de la perfumería solo utiliza la relación citronelol: geraniol (proporción C:G) para determinar la calidad del aceite. El rendimiento del aceite (en unidades de masa) se determinó con el peso del volumen de aceite en una báscula PGL 2002 Adam (EE. UU.) de inmediato después de la extracción.

Todas las variables se analizaron y se compararon estadísticamente con el PROC GLIMMIX, SAS versión 9.4 (PROC GLIMMIX, SAS Institute Inc., 2013). Los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). La prueba de Shapiro-Wilks se realizó para probar cualquier desviación de los datos de la distribución normal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestras de hojas del geranio rosa recuperado se colectaron para estudiar la densidad y morfología de la relación de los tricomas con la biosíntesis del aceite esencial después de los tratamientos con CK y GA

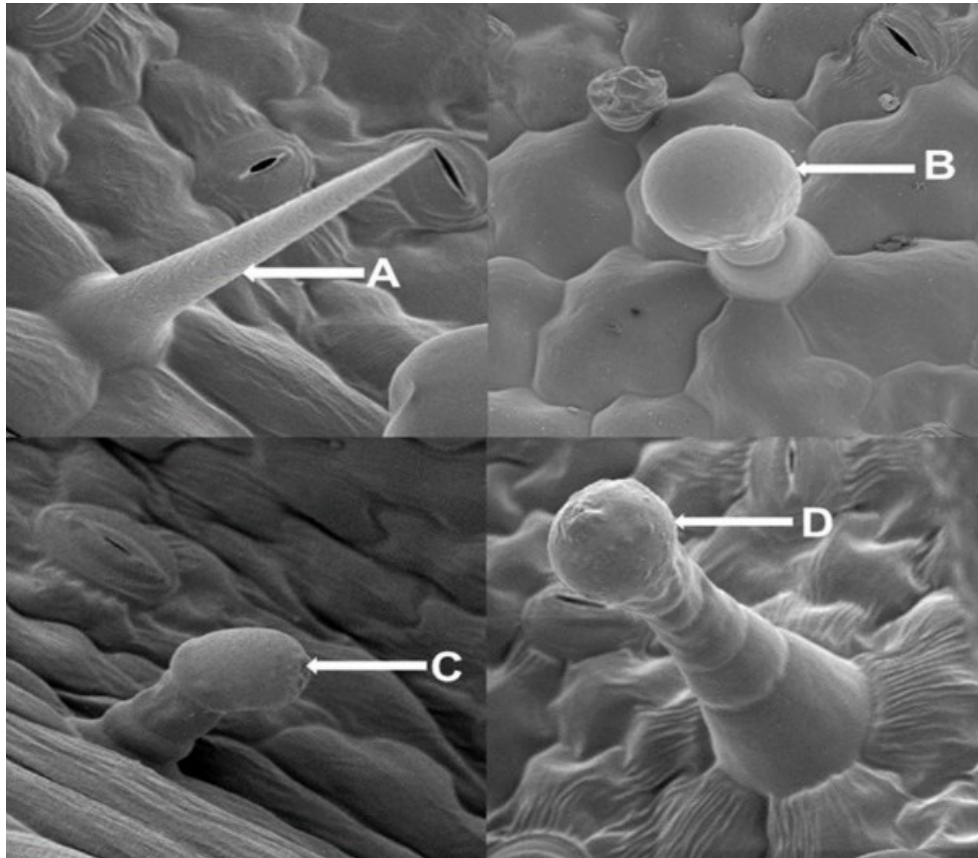


Figure 1. The four different types of trichomes found on the leaves of rose geranium as observed under a scanning electron microscope (400X magnifications) (Thitapoho farm, Tweespruit). A: non-glandular trichome; B: Brevicollate trichome; C: Asciiform trichome; D: Elongated-capitate trichome.

Figura 1. Los cuatro tipos diferentes de tricomas que se encontraron en las hojas del geranio rosa, observados bajo un microscopio electrónico de barrido (aumento 400X) (área productora Thitapoho, Tweespruit). A: tricoma no glandular; B: tricoma brevicollado; C: tricoma asciiforme; D: tricoma capitado alargado.

characteristics (Ma *et al.*, 2016). Thus, as evidenced in Figure 2 (micrograph 1, 2 and 3), all trichome group types were densely spaced on the abaxial leaf surface and scattered on the adaxial leaf surface. However, the attenuated trichome group tended to occur more densely near the midrib on the abaxial leaf surface, as shown in Figure 2 (micrograph 1, 2 and 3 on B, D and F). The hemispherical peltate trichome group tended to occur evenly spaced on the abaxial leaf blade surface but was mostly absent from the epidermis above the midrib vein.

Dense populations of trichomes on the abaxial leaf surface could be associated with the promotion of photosynthetic competence and establishment of phytochemical defence of leaves when mature (Ma *et al.*, 2016). Interestingly, the developmental pattern

aplicados por separado. Con independencia de cualquiera de las dosis CK y GA aplicadas por separado después de la defoliación, se observaron dos grupos de tricomas en las hojas de geranio rosa. Un grupo consistió en un tipo de tricoma no glandular que se considera de tipo atenuado (Figura 1A). El tricoma atenuado se caracteriza por un ahusamiento prolongado y gradual (Payne, 1978).

El segundo grupo consistió de tres tipos de tricomas glandulares, de los cuales un tipo pertenecía al tipo peltado. El tipo peltado se caracterizaba por un cuello corto con puntas redondas más grandes y se consideró como tricoma brevicollado (Figura 1B) (Payne, 1978). Los otros dos tipos pertenecen al grupo de los capitados. Un tipo de capitado consistió en un tipo de tricoma más pequeño, caracterizado por

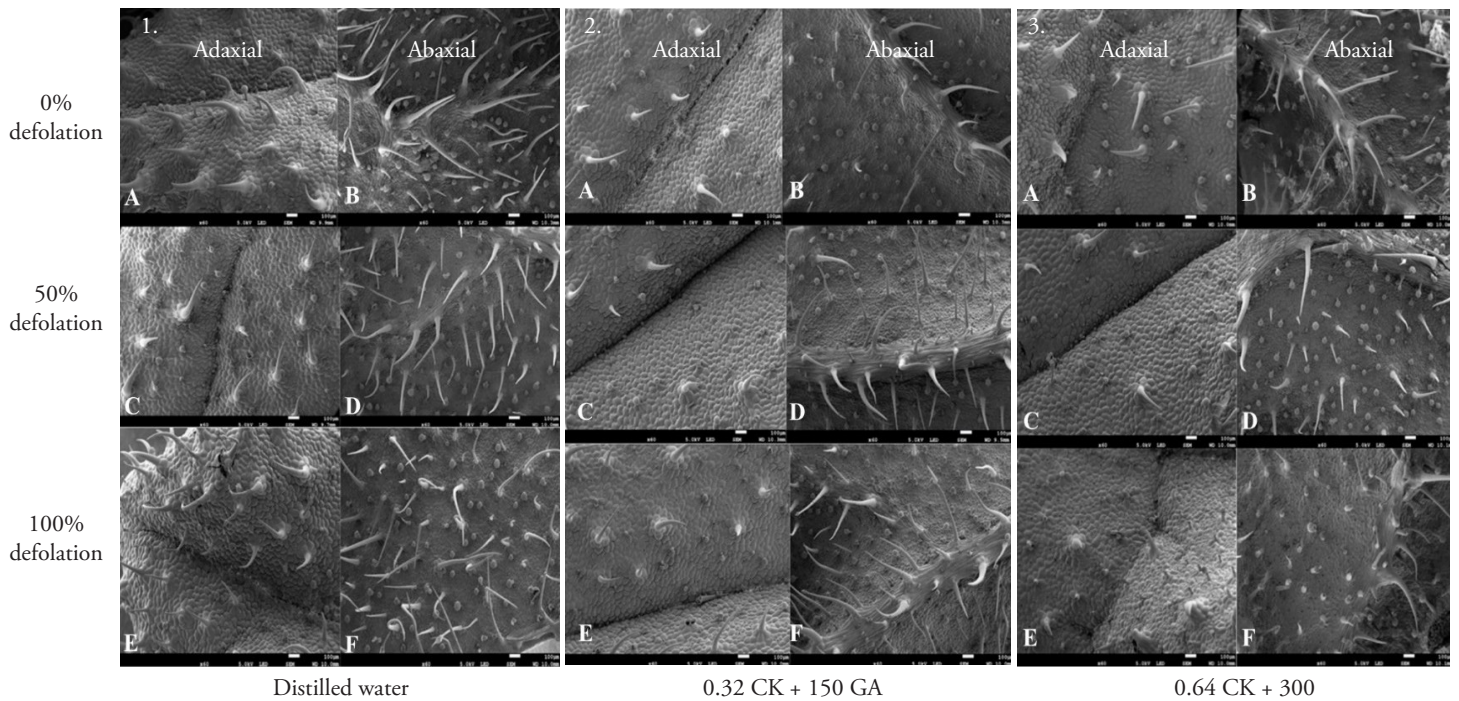


Figure 2. Newly developed leaf from the 0% defoliation (A and B), 50% (C and D) and 100% (E and F) defoliated rose geranium plants treated with distilled water (1.), split-applied $0.32 \text{ mg L}^{-1} \text{ CK} + 150 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA}$ (2.), and split-applied $0.64 \text{ mg L}^{-1} \text{ CK} + 300 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA}$ (3.) as observed under a scanning electron microscope (60X; $100 \mu\text{m}$).

Figura 2. Hoja recién desarrollada de las plantas de geranio rosa defoliadas al 0% (A y B), al 50% (C y D) y al 100% (E y F) defoliadas, tratadas con agua destilada (1.), aplicación por separado de $0.32 \text{ mg L}^{-1} \text{ CK} + 150 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA}$ (2.), y aplicación por separado de $0.64 \text{ mg L}^{-1} \text{ CK} + 300 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA}$ (3.), según se observó en un microscopio electrónico de barrido (60X; $100 \mu\text{m}$).

differed between the leaf surfaces of rose geranium. Similar heteroblastic series of trichomes patterns were observed on a rose geranium leaf, and this was claimed to be a genetic control by Romitelli and Martins (2013).

The density of trichomes may vary with variations in the environmental conditions, indicating the trade-offs between trichome traits, mainly to increase the resistance and the cost of trichome production (Ma *et al.*, 2016). In our study, the non-glandular trichomes were not considered since they are not associated with essential oil biosynthesis.

The density of brevicollate trichome on both leaf surfaces significantly declined with high concentrations of split-applied CK and GA (0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA), as shown in Tables 1 and 2. No studies could be found in the literature about the effects of split-applying CK and GA on the brevicollate trichome density. However, Liu *et al.* (2017) reported that the unspecified glandular trichome density per cm² on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves decreased with up to 50 trichomes when plants were treated with 17.3 mg L⁻¹ GA. Thus, the decline in the brevicollate trichome density in this study could be due to the GA application at the later stage.

The interaction between the defoliation and split-applying CK and GA concentrations affected the asciform trichome density on both leaf surfaces (Tables 1 and 2). A difference of nine asciform trichomes less on the adaxial leaf surface was recorded when a lower concentration of CK + GA (0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA) was split-applied where plants endured 50% defoliation (Table 1). On the abaxial leaf surface, the asciform trichome density varied because of defoliation and split-applying CK and GA; however, these effects were not statistically different when compared to the control (Table 2). In this study, the density of the asciform trichome group differed between the leaf surfaces, as the abaxial leaf position had significantly ($p \leq 0.02$) higher asciform trichome density.

Reduced density of asciform trichome group on the adaxial leaf surface resulted from the transformation of the asciform trichome into elongated-capitate trichome, of which the increase in density is illustrated in Table 1. The combination of endogenous developmental programmes and the external signals regulates the developmental

un segmento capitado corto con una punta columnar en forma de hacha que tiene una célula apical ligeramente doblada que apunta al ápice de la hoja, conocido como tricoma asciforme (Figura 1C) (Payne, 1978). El segundo tipo de capitado consistió en cuerpos con segmentos alargados en forma de matraz que culminan en una cabeza redonda, con características similares al asciforme y se consideró como tipo capitado alargado (Figura 1D).

La variación en los tipos de tricomas puede desempeñar un papel diferente en la fisiología y ecología de las plantas con características morfológicas, mecánicas y fitoquímicas variables (Ma *et al.*, 2016). Por lo tanto, como se evidencia en la Figura 2 (microfotografía 1, 2 y 3), todos los tipos de grupos de tricomas estaban densamente espaciados en la superficie abaxial de la hoja y dispersos en la superficie adaxial. Sin embargo, el grupo de tricomas atenuados tendió a ocurrir más densamente cerca de la nervadura central en la superficie abaxial de la hoja, como se muestra en la Figura 2 (B, D y F en las microfotografías 1, 2 y 3). El grupo de tricomas peltados hemisféricos tendió a aparecer con espaciamiento uniforme espaciado en la superficie abaxial de la lámina de la hoja, pero en su mayoría estuvo ausente de la epidermis superior de la nervadura central.

Poblaciones densas de tricomas en la superficie abaxial de la hoja podrían estar relacionadas con la promoción de la competencia fotosintética y el establecimiento de la defensa fitoquímica en la madurez de las hojas (Ma *et al.*, 2016). El patrón de desarrollo difirió entre las superficies de las hojas del geranio rosa, lo cual es interesante. Series heteroblásticas similares a patrones de tricomas se observaron en las hojas de geranio rosa; Romitelli y Martins (2013) afirmaron que esto se debía un control genético.

La densidad de los tricomas puede variar con los cambios en las condiciones ambientales, esto indica que hay compensaciones entre los rasgos de los tricomas, principalmente para aumentar la resistencia en relación con el costo de producción de los tricomas (Ma *et al.*, 2016). En nuestro estudio, los tricomas no glandulares no se consideraron ya que no están relacionados con la biosíntesis del aceite esencial.

La densidad del tricoma brevicollado en ambas superficies de las hojas disminuyó significativamente con las altas concentraciones de CK y GA (0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA) aplicadas por separado, tal como se muestra en los Cuadros 1 y 2. No se

Table 1. Effects of defoliation and split-application of combined solutions CK and GA on density of glandular trichome observed on the adaxial leaf surface of rose geranium plant leaf (Thitapoho farm, Tweespruit).

Cuadro 1. Efectos de la defoliación y la aplicación por separado de soluciones combinadas de CK y GA sobre la densidad de los tricomas glandulares observados en la superficie adaxial de la hoja de plantas de geranio rosa (área productora Thitapoho, Tweespruit).

Treatments	Elongated Capitata	Asciiform	Brevicollate
Defoliation			
0% defoliation	17.77 ± 1.05 b	5.55 ± 2.24 c	41.88 ± 15.16 a
50% defoliation	24.00 ± 1.49 b	9.88 ± 4.53 a	47.66 ± 12.45 a
100% defoliation	38.66 ± 1.15 a	7.66 ± 2.00 b	34.44 ± 11.59 a
F-value	12.97	10.50	2.72
P-value	0.01	0.01	0.09
CK + GA			
Distilled water	18.88 ± 0.62 b	10.22 ± 3.39 a	47.11 ± 16.35 a
CK 0.32 + GA 150	24.77 ± 1.17 b	5.77 ± 1.71 b	45.22 ± 13.18 a
CK 0.64 + GA 300	36.77 ± 1.23 a	7.11 ± 3.21 b	31.66 ± 11.15 b
F-value	9.37	11.64	4.39
P-value	0.01	0.01	0.02
Defoliation x CK + GA			
F-value	10.49	3.74	0.45
P-value	0.02	0.02	0.77

Means with different letter in a column are statistically significant (Tukey; $p \leq 0.05$). ♦ Letras diferentes en medias por columna indican diferencia estadística significativa (Tukey; $p \leq 0.05$).

Table 2. Effects of defoliation and split-application of CK and GA on density of glandular trichome observed on the abaxial leaf surface of rose geranium plant leaf (Thitapoho farm, Tweespruit).

Cuadro 2. Efectos de la defoliación y las aplicaciones separadas de CK y GA sobre la densidad de los tricomas glandulares observados en la superficie abaxial de las hojas de plantas de geranio rosa (área productora Thitapoho, Tweespruit).

Treatments	Elongated Capitata	Asciiform	Brevicollate
Defoliation			
0% defoliation	1.33 ± 3.22 a	13.55 ± 5.63 b	17.88 ± 4.91 a
50% defoliation	2.11 ± 2.08 a	25.88 ± 6.64 a	18.55 ± 4.97 a
100% defoliation	2.88 ± 1.40 a	17.00 ± 7.33 b	16.77 ± 9.20 a
F-value	3.44	12.40	0.35
P-value	0.06	0.01	0.71
CK + GA			
Distilled water	0.66 ± 0.51 b	18.11 ± 5.15 a	21.00 ± 6.85 a
CK 0.32 + GA 150	1.77 ± 0.76 b	16.88 ± 9.70 a	19.88 ± 5.23 a
CK 0.64 + GA 300	3.88 ± 1.11 a	21.44 ± 9.35 a	12.33 ± 3.31 b
F-value	15.23	1.70	9.53
P-value	0.01	0.21	0.01
Defoliation x CK + GA			
F-value	9.51	3.42	2.09
P-value	0.01	0.03	0.12

Means with different letter in a column are statistically significant (Tukey; $p \leq 0.05$). ♦ Letras diferentes en medias por columna indican diferencia estadística significativa (Tukey; $p \leq 0.05$).

distribution of trichomes on plant leaves (Xue *et al.*, 2019). Thus, under extreme external stimuli such as complete defoliation (100%), the endogenous phytohormones are only synchronised to regenerate the lost material, and directly affect leaf expansion and the trichome developmental rate.

GA is the first phytohormone molecule that regulates the initiation and morphogenesis of trichome development, followed by CK. Thus, activities associated with asciform trichome development could also be attributed to a high concentration of 300 mg L⁻¹ GA applied in the later stage than the 0.64 mg L⁻¹ CK applied earlier following the wounding and defoliation stimuli.

According to Zhou *et al.* (2013), this could be associated with the activities of *ZFP6* and *ZFP5* transcription factors from GA and CK, respectively. GA could have activated the transcription of the *ZFP6* gene earlier, being a member of the large *C2H2* regulatory gene family; then followed by CKs promotion of the *ZP6*, *ZFP8*, and *GIS2* expression later. Therefore, CK could have been involved with auxin in the restoration of the plant material rather than development of trichome at an early stage; while GA could have initiated trichome development (Ma *et al.*, 2016; Fambrini and Pugliesi, 2019). Jiao (2016) reported the accumulation of GA through *TEM 1* and *2* genes in the mesophyll cells, but not in the epidermis, suggesting that the homeostasis and distribution of GA in the mesophyll cells affect the trichome formation in the epidermis. *TEMs* also regulate signalling of CK at the later stage through *MYB/bHLH/WD* activator complex, phytohormones that also promote trichome formation (Zhou *et al.*, 2013; Fambrini and Pugliesi, 2019).

The interaction between the defoliation and split-applying CK and GA concentrations affected the elongated-capitate trichome density on both leaf surfaces (Table 1 and 2). On the adaxial leaf surface, the density of the elongated-capitate trichome was increased ($f=2.66$; $p\leq 0.002$) by 25.6 trichomes where lower concentrations of split-applied CK and GA (0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA) were applied (Table 1). This occurred where plants endured 50% defoliation; however, this was not statistically different compared to higher concentrations (0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA) of split-applied CK and GA. This interaction was not observed where plants endured extreme defoliation extent (100%).

encontraron estudios en la literatura sobre los efectos de la aplicación por separado de CK y GA sobre la densidad de tricomas brevicolados. Sin embargo, Liu *et al.* (2017) informaron sobre la densidad de tricomas glandulares no especificados por cm² en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) disminuyó hasta en 50 tricomas cuando las plantas se trataron con 17.3 mg L⁻¹ GA. Por lo tanto, la disminución en la densidad de tricomas brevicolados en este estudio podría deberse a la aplicación de GA en la etapa más tardía.

La interacción entre la defoliación y las concentraciones de CK y GA aplicadas por separado afectó la densidad de tricomas asciformes en las dos superficies de las hojas (Cuadros 1 y 2).

Una diferencia de nueve tricomas asciformes menos en la superficie adaxial de la hoja se registró cuando se aplicó por separado la concentración más baja de CK + GA (0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA), con ella las plantas toleraron una defoliación del 50% (Cuadro 1). En la superficie abaxial de la hoja, la densidad del tricoma asciforme varió debido a la defoliación y la aplicación de CK y GA por separado; sin embargo, estos efectos no mostraron diferencia estadística en comparación con el control (Cuadro 2). En nuestro estudio, la densidad del grupo de tricomas asciformes difirió entre las superficies de las hojas, ya que la posición abaxial de la hoja tuvo una densidad de tricomas asciformes significativamente ($p\leq 0.02$) mayor.

La reducción en la densidad del grupo de tricomas asciformes en la superficie adaxial de la hoja resultó de la transformación de tricomas asciformes en tricomas capitados alargados, cuyo aumento de densidad se incluyó en el Cuadro 1. La combinación del programa endógeno para el desarrollo y las señales externas regulan la distribución de los tricomas de las hojas durante el desarrollo de la plantas (Xue *et al.*, 2019). Así, bajo estímulos externos extremos como una defoliación completa (100%), los fitorreguladores endógenos solo se sincronizan para regenerar el material perdido y afectan directamente la expansión foliar y la tasa de desarrollo de los tricomas.

La molécula GA es el fitorregulador principal que regula el inicio y la morfogénesis del desarrollo de tricomas, seguido de CK. Por lo tanto, las actividades relacionadas con el desarrollo de tricomas asciformes también podrían atribuirse a una concentración alta de 300 mg L⁻¹ de GA aplicada en una etapa posterior a los 0.64 mg L⁻¹ de CK aplicados antes, luego del estímulo de daños por cortes y defoliación.

On the abaxial leaf surface, the elongated-capitate trichome density was significantly increased by 4 ($p \leq 0.01$) and 6.6 trichomes ($p \leq 0.001$) on plants that endured 50 and 100% defoliation compared to the control, respectively (Table 2).

The increase in elongated-capitate trichome density occurred when plants were treated with a high concentration of split-applied CK and GA (0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA). From this study, the density of the elongated-capitate trichome significantly ($p \leq 0.02$) differed between the leaf surfaces, for which the adaxial leaf surface had a higher density of elongated-capitate trichome group compared to the abaxial surface occurring at any level of defoliation (50 or 100%).

Although the developmental stages of capitate trichome type were not observed in this study, split-applied CK and GA regardless application level stimulated the elongation of the asciiform trichome stalk to form the elongated-capitate trichome, mostly where plants endured defoliation (50 and 100%). Therefore, this could indicate that split-applied CK and GA on newly developed rose geranium leaves stimulate the transformation of the asciiform trichomes into the elongated-capitate trichomes. Barnes (2013) reported that changes in the endogenous ratios of split-applying CK and GA often cause alterations on morphological features such as extra-large leaves or elongated stems, and extensive shoot proliferation where plants endured biotic and abiotic stresses. In our study, this could have been the case, where the asciiform trichome could have traded-off its morphology to respond to defoliation and split-applied CK and GA.

The glandular cell at the tip of the trichome, the head cell, displays many ultrastructural features for which is their ability to synthesise and secrete large amounts, relative to their size, of a limited number of specialized metabolites (Hulchemann *et al.*, 2017). In our study, elongated-capitate trichome is a stretched out asciiform trichome, containing a shrivelled head, which could indicate a lack of stored essential oil in their sub-cuticular spaces. Also, Eiasu *et al.* (2009) reported that the capitate group lack stored essential oil in their sub-cuticular spaces compared to the brevicollate trichome. Thus, the non-significant results on the essential oil yield traits were attributed to the declined peltate and increased capitate trichome results (Table 3).

Según Zhou *et al.* (2013), esto podría estar relacionado con las actividades de los factores de transcripción *ZFP6* y *ZFP5* del GA y CK, respectivamente. GA podría haber activado la transcripción del gen *ZFP6* antes, por ser un miembro de la gran familia de genes reguladores *C2H2*; seguida más tarde por la promoción de la expresión de los transcritos *ZP6*, *ZFP8* y *GIS2* del CK. Por lo tanto, la CK pudo haber estado involucrada con la auxina en la restauración del material vegetal más que con el desarrollo de tricomas en una etapa temprana; mientras que GA pudo haber iniciado el desarrollo de los tricomas (Ma *et al.*, 2016; Fambrini y Pugliesi, 2019). Jiao (2016) observó la acumulación de GA a través de los genes *TEM 1* y *2* en las células del mesófilo, pero no en la epidermis; esto sugiere que la homeostasis y la distribución de GA en las células del mesófilo afectan la formación de tricomas en la epidermis. Los TEMs también regulan la señalización de la CK en la etapa tardía a través del complejo activador *MYB/bHLH/WD*, fitorreguladores que también promueven la formación de tricomas (Zhou *et al.*, 2013; Fambrini y Pugliesi, 2019).

La interacción entre la defoliación y las concentraciones de CK y GA en aplicación por separado afectó la densidad de tricomas capitados alargados en ambas superficies de las hojas (Cuadros 1 y 2). En la superficie adaxial de la hoja, la densidad de los tricomas capitados alargados aumentó ($f=2.66$; $p \leq 0.002$) en 25.6 tricomas, cuando se aplicaron por separado las concentraciones más bajas de CK y GA (0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA) (Cuadro 1). Esto ocurrió cuando las plantas sufrieron una defoliación del 50%; sin embargo, esto no mostró diferencia estadística en comparación con las concentraciones más altas de CK y GA (0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA) aplicadas por separado. Esta interacción no se observó cuando las plantas sufrieron una defoliación extrema (100%).

En la superficie de la hoja abaxial, la densidad de tricomas capitados alargados aumentó significativamente en 4 ($p \leq 0.01$) y 6.6 tricomas ($p \leq 0.001$) en plantas que soportaron 50 y 100% de defoliación en comparación con el control, respectivamente (Cuadro 2).

El aumento en la densidad de tricomas capitados alargados se produjo cuando las plantas se trataron con una concentración alta de CK y GA en aplicaciones separadas (0.64 mg L⁻¹ CK + 300 mg L⁻¹ GA). De acuerdo con nuestro estudio, la densidad

Table 3. Effects of defoliation and split-application of CK and GA on essential oil yield attributes of rose geranium (Thitapoho farm, Tweespruit).**Cuadro 3. Efectos de la defoliación y la aplicación por separado de CK y GA sobre los atributos del rendimiento de aceite esencial de geranio rosa (área productora Thitapoho, Tweespruit).**

Treatments	Oil mass (g)	Oil content (%)
Defoliation		
0% defoliation	0.14 ± 0.04 a	0.10 ± 0.03 a
50% defoliation	0.15 ± 0.07 a	0.13 ± 0.06 a
100% defoliation	0.11 ± 0.05 a	0.14 ± 0.08 a
F-value	1.58	0.98
P-value	0.23	0.39
CK + GA		
Distilled water	0.15 ± 0.07 a	0.14 ± 0.05 a
CK 0.32 + GA 150	0.13 ± 0.04 a	0.12 ± 0.04 a
CK 0.64 + GA 300	0.12 ± 0.06 a	0.12 ± 0.09 a
F-value	0.82	0.16
P-value	0.45	0.85
Defoliation x CK + GA		
F-value	0.57	0.26
P-value	0.69	0.89

Means with different letter in a column are statistically significant (Tukey; $p \leq 0.05$). ♦ Letras diferentes en medias por columna indican diferencia estadística significativa (Tukey; $p \leq 0.05$).

In this study, only the relative proportion of citronellol and geraniol were discussed to determine the essential oil quality. Linalool, citronellyl formate, geranyl formate, and guaia-6,9-diene were not affected by the defoliation treatments (data not showed). Moreover, geraniol content and the citronellol and geraniol ratio (C:G ratio) were also not affected by the treatments (Table 4).

A significant interaction was observed between defoliation levels and the different concentrations of split-applied CK and GA on the citronellol content (Table 4). Citronellol content ($p \leq 0.0002$) also tended to increase by 4.6% compared to the control when plants endured 100% defoliation and subsequently treated with a low concentration of split-applied CK and GA (0.32 mg L⁻¹ CK + 150 mg L⁻¹ GA). Findings in this study indicate that when plants endured hail damage, citronellol accumulated in response to physiological stress. However, subsequently split-applying CK and GA on plants would have led to further increase in citronellol content.

del tricoma capitados alargados mostró diferencia estadística ($p \leq 0.02$) entre las superficies de las hojas; por lo tanto, la superficie adaxial de la hoja tuvo una densidad más alta del tipo de tricomas capitados alargados en comparación con la superficie abaxial, lo cual ocurrió en cualquiera de los niveles de defoliación (50 o 100%).

Aunque en este estudio no se observaron las etapas de desarrollo de los tricomas de tipo capitado, las aplicaciones por separado de CK y GA, con independencia del nivel de aplicación, estimularon el alargamiento del tallo de los tricomas asciformes para formar tricomas capitados alargados, en especial cuando las plantas sufrieron defoliación (50 y 100%). Por lo tanto, esto podría indicar que las aplicaciones por separado de CK y GA en hojas de geranio rosa recién desarrolladas estimulan la transformación de los tricomas asciformes en tricomas capitados alargados. Barnes (2013) informó que los cambios en las proporciones endógenas de CK y GA debidas a su aplicación por separado con frecuencia causan

Table 4. Effects of defoliation and split-application of CK and GA on selected essential oil quality compounds of rose geranium (Thitapoho farm, Tweespruit).
Cuadro 4. Efectos de la defoliación y la aplicación por separado de CK y GA en compuestos selectos de calidad del aceite esencial de geranio rosa (área productora Thitapoho, Tweespruit).

Treatments	Citronellol	Geraniol	[†] C:G
Defoliation			
0% defoliation	4.81 ± 1.52 b	0.90 ± 0.50 a	5.34 ± 1.51 a
50% defoliation	2.90 ± 1.13 c	0.93 ± 0.01 a	3.11 ± 1.28 a
100% defoliation	6.48 ± 2.99 a	1.21 ± 0.05 a	5.35 ± 1.26 a
F-value	27.06	0.55	2.60
P-value	0.01	0.61	0.16
CK + GA			
Distilled water	4.37 ± 2.33 b	0.93 ± 0.57 a	4.69 ± 1.33 a
CK 0.32 + GA 150	5.78 ± 3.45 a	0.74 ± 0.01 a	7.81 ± 1.55 a
CK 0.64 + GA 300	4.04 ± 1.32 b	0.71 ± 0.02 a	5.64 ± 1.47 a
F-value	6.93	1.01	3.75
P-value	0.01	0.42	0.09
Defoliation x CK + GA			
F-value	9.20	0.89	1.37
P-value	0.01	0.46	0.35

Means with different letter in a column are statistically significant (Tukey; $p \leq 0.05$). [†]C:G = C:G ratio. ♦ Letras diferentes en medias por columna indican diferencia estadística significativa (Tukey; $p \leq 0.05$). [†]C:G = proporción C:G.

CONCLUSIONS

Results from this study demonstrated that recovered rose geranium leaves developed higher density of the elongated-capitate trichome on the adaxial leaf surface following hail damage simulation and subsequent split-application of cytokinin (CK) and gibberellic acid (GA) compared to control. This is ascribed to elongation of the asciiform trichome to form the elongated-capitate trichome, mainly caused by the antagonistic cross-signalling effects between these growth regulators.

Split-application of cytokinin and gibberellic acid decreased the density of the brevicollate trichome; causing counter-productive results on essential oil yield. The application of low concentration of split-applied CK and GA improved the citronellol content, especially where plants endured 100% defoliation. The split-application of CK and GA phytohormones did affect the transformation of trichome morphology and density per leaf area; and consequently, affected citronellol, the key essential oil compound, when rose geranium plants endured simulated hail damage.

alteraciones en las características morfológicas, como hojas extragrandes o tallos alargados, y una proliferación extensa de brotes cuando las plantas han tolerado estrés biótico y abiótico. En nuestro estudio, éste pudo ser el caso, ya que el tricoma asciiforme pudo haber cambiado su morfología en respuesta a la defoliación y a CK y GA aplicados por separado.

La célula glandular en la punta del tricoma, que es la célula capital, muestra muchas características ultraestructurales que explican su capacidad para sintetizar y secretar grandes cantidades, en relación con su tamaño, de un número limitado de metabolitos especializados (Hulchemann *et al.*, 2017). En nuestro estudio, el tricoma capitado alargado es un tricoma asciiforme estirado con una cabeza arrugada, lo cual podría indicar una falta de aceite esencial almacenado en sus espacios subcuticulares. Además, Eiasu *et al.* (2009) informaron que el grupo de capitados carecía de aceite esencial almacenado en sus espacios subcuticulares en comparación con los tricomas brevicollados. Por lo tanto, los resultados no significativos en el rendimiento de aceite esencial se atribuyeron a los resultados de disminución de peltados y al aumento de los tricomas capitados (Cuadro 3).

ACKNOWLEDGEMENTS

To the National Research Foundation of South Africa for the whole funding (Grant No: 107020 and 116757) of this research. To Ms. Hanlie Grobler (University of the Free State, RSA), our special gratitude for her technical contributions in scanning electronic microscopy techniques; and to Mr. Calvin Mabuso for data collection.

LITERATURE CITED

- Barnes, H. W. 2013. Gibberellins and cytokinins: A review. *ISHS Acta Hort.* 1055: 323-336.
- Cato, S., C. Macedo, W. R. Peres, L. E. P. and P. R. de Castro. 2013. Synergism among auxins, gibberellins and cytokinins in tomato cv. micro-tom. *Hortic. Bras.* 31: 549-553.
- Egamberdieva, D., S. J. Wirth, A. A. Alqarawi, E. F. Abd_Allah, and A. Hashem. 2017. Phytohormones and beneficial microbes: Essential components for plants to balance stress and fitness. *Front Microbiol.* 8: 2104.
- Eiasu, B. K., J. M. Steyn, and P. Soundy. 2009. Rose-scented geranium (*Pelargonium capitatum* x *P. radens*) growth and essential oil yield response to different soil water depletion regimes. *Agric. Water Manage.* 96: 991-1000.
- Fambrini, M., and C. Pugliesi. 2019. The dynamic genetic-hormonal regulatory network controlling the trichome development in leaves. *Plants* 8: 253.
- Gálea, I. C., I. Ielciu, G. Crişan, and M. Tămaş. 2017. Histological studies on the vegetative and reproductive organs of *Pelargonium roseum* Willd. (Geraniaceae). *Hop and Med. Plants* 1-2.
- Hulchemann, A., M. Boutry, and C. Hachez. 2017. Plant glandular trichomes: natural cell factories of high biotechnological interest. *Plant Physiol.* 175: 6-22.
- Ikeuchi, M., A. Iwase, B. Rymen, A. Lambalez, M. Kojima, Y. Takebayashi, J. Heyman, S. Watanabe, M. Seo, L. De Veylder, H. Sakakibara, and K. Sugimoto. 2017. Wounding triggers callus formation via dynamic hormonal and transcriptional changes. *Plant Physiol.* 175: 1158-1174.
- Irigoyen, I., I. Domeno, and J. Muro. 2010. Effect of defoliation by simulated hail damage on yield of potato cultivars with different maturity performed in Spain. *Am. J. Potato Res.* 88: 82-90.
- Jiao, Y. 2016. Trichome formation: Gibberellins on the move. *Plant Physiol.* 170: 1174-1175.
- Koprna, R., N. De Diego, N. Dundálková, L. and L. Spíchal. 2016. Use of cytokinins as agrochemicals. *Bioorg. Med. Chem.* 24: 484-492.
- Liu, Y., D. Liu, R. Hu, C. Hua, I. Ali, A. Zhang, B. Liu, M. Wu, L. Huang, and Y. Gan. 2017. AtGIS, a C2H2 zinc-finger transcription factor from Arabidopsis regulates glandular trichome development through GA signalling in tobacco. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483: 209-215.
- Ma, D., Y. Hu, C. Yang, B. Liu, L. Fang, Q. Wan, W. Liang, G. Mei, L. Wang, H. Wang, L. Ding, C. Dong, M. Pan, J. Chen, S. Wang, S. Chen, C. Cai, X. Zhu, X. Guan, B. Zhou, S. Zhu, J. Wang, W. Guo, X. Chen, and T. Zhang. 2016. Genetic basis for glandular trichome formation in cotton.

En nuestro estudio sólo se discutió la proporción relativa de citronelol y geraniol para determinar la calidad del aceite esencial. Linalol, formiato de citronelilo, formiato de geraniol y guaya-6,9-dieno no se vieron afectados por los tratamientos de defoliación (datos no mostrados). Además, los tratamientos tampoco afectaron el contenido de geraniol y la relación citronelol:geraniol (proporción C:G) (Cuadro 4).

Una interacción significativa se observó entre los niveles de defoliación y las concentraciones diferentes de CK y GA aplicadas por separado sobre el contenido de citronelol (Cuadro 4). El contenido de citronelol ($p \leq 0.0002$) también tendió a aumentar en un 4.6% en comparación con el control cuando las plantas sufrieron una defoliación del 100%, y después se trataron con concentraciones bajas de CK y GA aplicadas por separado (0.32 mg L^{-1} CK + 150 mg L^{-1} GA). Los hallazgos de este estudio indican que cuando las plantas sufrieron daños por granizo, el citronelol se acumuló en respuesta al estrés fisiológico. Sin embargo, la subsecuente aplicación por separado de CK y GA en las plantas habría generado un incremento adicional en el contenido de citronelol.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demostraron que las hojas de geranio rosa recuperadas desarrollaron una densidad mayor de tricomas capitados alargados en la superficie adaxial de la hoja después de la simulación de daños por granizo y las subsecuentes aplicaciones por separado de soluciones de citoquinina (CK) y ácido giberélico (GA) en comparación con el control. Esto se atribuye al alargamiento de los tricomas esciiformes para formar tricomas capitados alargados, causado principalmente por los efectos antagonistas de señalización cruzada entre estos reguladores del crecimiento.

La aplicación en dosis separadas de soluciones de citoquinina y ácido giberélico disminuyó la densidad del tricoma breviculado, lo cual causó resultados contraproducentes en el rendimiento del aceite esencial. La aplicación de concentraciones bajas de CK y GA aplicadas por separado mejoró el contenido de citronelol, en especial cuando las plantas toleraron una defoliación del 100%. La aplicación por separado de los fitorreguladores CK y GA afectó la transformación de la morfología de los tricomas y de su densidad por área foliar. En consecuencia afectó

- Nat. Commun. 7: 10456.
- Nanda, A.K., and C.W. Melnyk. 2018. The role of plant hormone during grafting. *J. Plant Res.* 131: 49-58.
- Oosthuizen, L., and J. Coetzee. 1984. Morphogenesis of trichomes of *Perlagonium scabrum*. *S. Afr. J. Bot.* 2: 305-310.
- Paradiković, N., T. Teklić, S. Zeljković, M. Lisjak, and M. Špoljarević. 2019. Biostimulants research in some horticultural plant species-A review. *Food Energy Secur.* 8: e00162.
- Payne, W. 1978. A glossary of plant hair terminology. *Brittonia* 30: 239-255.
- Romitelli, I., and M. B. G. Martins. 2013. Comparison of leaf morphology and anatomy among *Malva sylvestris* ("gerânio-aromático"), *Pelargonium graveolens* ("falsa-malva") and *Pelargonium odoratissimum* ("gerânio-de-cheiro"). *Rev. Bras. Plantas Med.* 15:91-97.
- Sakamoto, T., N. Kamiya, Ueguchi-Tanaka, M. Iwahori, S. and M. Matsuoka. 2001. KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Genes Dev.* 15: 581-590.
- Sedibe, M. M., Z. P. Khetsha, and N. Malebo. 2013. Salinity effects on external and internal morphology of rose geranium (*Pelargonium graveolens* L.) leaf. *Life Sci.* 10: 99-103.
- Sharma, A., A. Khanal, and B. Dhital. 2018. Effect of gibberellic acid on post-harvest shelf-life and quality of tomato. *J. Post Harvest Technol.* 06: 82-90.
- Wang, M. H., J. R. Wang, X. W. Zhang, A. P. Zhang, S. Sun, and C. M. Zhao. 2019. Phenotypic plasticity of stomatal and photosynthetic features of four *Picea* species in two contrasting common gardens. *AoB Plants* 1-10.

al citronelol, el compuesto clave del aceite esencial, cuando las plantas de geranio rosa toleraron la simulación de daños por granizo.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación Nacional de Investigación de Sudáfrica por el financiamiento (Beca No: 107020 y 116757) de esta investigación en su totalidad. A la Sra. Hanlie Grobler (University of the Free State, RSA), nuestro agradecimiento especial por su contribución en las técnicas de microscopía electrónica de barrido, y al Sr. Calvin Mabuso por el registro de datos.

—Fin de la versión en Español—



- Xue, S., M. Dong, L. Xingwang, S. Xu, J. Pang, W. Zhang, Y. Weng, and H. Ren. 2019. Classification of fruit trichomes in cucumber and effects of plant hormones on type II fruit trichome development. *Planta* 249: 407-416.
- Yue, Y., L. Zhou, A. Zhu, and X. Ye. 2019. Vulnerability of cotton subjected to hail damage. *PLoS ONE* 14: e0210787.
- Zhou, Z., L. Sun, Y. Zhao, L. An, A. Yan, X. Meng, and Y. Gan. 2013. Zinc Finger Protein 6 (ZFP6) regulates trichome initiation by integrating gibberellin and cytokinin signaling in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 198: 699-708.