

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**ESTUDIO DE LA RIZOGÉNESIS EN LA PROPAGACIÓN
VEGETATIVA MONOCLONAL DE *Prosopis alba* GRISEBACH
(ALGARROBO BLANCO)**

Ing. Agr. M.Sc. Jonicélia Cristina Araújo Vieira de Souza

Director de Tesis: Dr. Abelardo C. Vegetti - FCA (UNL) - CONICET

Co-director de Tesis: Dr. Luis A. Mroginski - IBONE (UNNE-CONICET)

Consejera: Deborah Guerra Barroso – UENF

Facultad de Ciencias Agrarias (UNL) - CONICET

-2015-

Ficha Catalográfica

Souza, Jonicélia Cristina Araújo Vieira de

Estudio de la Rizogénesis de *Prosopis alba* (Algarrobo blanco) / Jonicélia Cristina Araújo Vieira de Souza. _ 2015.

179 f. : il.

Director: Vegetti, Abelardo; Co-director: Mroginski, Luis Amado; Consejera: Deborah Guerra Barroso

Disertación (Doctorado en Ciencias Biológicas) – Universidad Nacional Del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Santa Fe de la Vera Cruz, Santa Fe, 2014.

1. Silvicultura clonal 2. Algarrobo blanco 3. Enraizamiento 4. Propagación vegetativa.

Dedico

A nuestro magnifico DIOS

A mi amada familia

A mi querida FCA- UNL

A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inmensamente a nuestro grandioso Dios por su presencia y providencia en mi vida.

A la FCA-UNL y a todo su personal docente y no docente por todo el apoyo y principalmente por hacer con que me apasione por nuestra institución. A cada uno de Ustedes agradezco inmensamente y con mucho orgullo que pertenezco a esta Facultad y los tengo como compañeros.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por concederme Beca Doctoral Latinoamericana y Beca Doctoral Tipo II para realizar mi doctorado en Argentina. Y por permitirme seguir concediéndome una beca posdoctoral para dar continuidad a esta línea de investigación.

A la UNL por el financiamiento a los proyectos vinculados a esta tesis. CAID y CAID Orientados y también a la Provincia de Santa Fe por el financiamiento del Proyecto I+D+i.

A la Secretaría de Ciencia y Tecnología y a la dirección de posgrado de la FBCB por darme la oportunidad de hacer parte de su carrera doctoral.

A mi Director, Dr. Abelardo Vegetti, que me ha conducido hasta la finalización de este trabajo y me apoyado en todos mis proyectos profesionales y personales. Te estimo muchísimo y soy muy agradecida a vos por tu apoyo incondicional. Obrigada Abelardo!

A mi codirector Dr. Luis Mroginski – IBONE (CONICET-UNNE), por su contribución en mi formación y todo el apoyo concedido. Luis fue un honor para mí tenerte como codirector.

A mi consejera Dra. Deborah Guerra Barroso por toda colaboración en este trabajo, por mi formación profesional y por su estimada amistad.

A Carmen Vega y Aníbal Verga (IFRGV) por su colaboración en los análisis de caracterización genética.

A Mirta Faloci (UNNE) por su colaboración y enorme predisposición en los análisis de peroxidasas.

A Peter Felker y a Mauricio Ewens por todo lo que me enseñaron sobre el manejo de la especie y por las informaciones y resultados generados en los trabajos de propagación que anteceden a éste.

Al CCA-UFES (Espírito Santo), UENF (Rio de Janeiro) y UFLA (Minas Gerais) por su contribución en mi formación profesional.

A mis compañeros de la Cátedra de Dasonomía por el apoyo y amistad en estos años de trabajo en especial a Adrián Bender, a Daniel Temporelli, a nuestros pasantes alumnos y graduados (en especial a Ángeles, Mariana y Noelí que además de la amistad participaron de partes de los ensayos y evaluaciones de esta tesis), así como a mis dirigidos de especialización y maestría y también a Marcela Candiotti (Ministerio de Producción de la Provincia de Santa Fe), Francisco Cardozo (INTA), José Ruchesi (Escuela de Jardinería e Instituto de Biotecnología Agroforestal del Chaco), que vienen trabajando con nosotros en inúmeros proyectos entre otros colaboradores de Cátedra.

A los colegas del Depto. de Producción Vegetal (Norberto, Carlos, Rubén, Norma Micheloud, Norma Álvarez, Marcela, Damián, Paola, Melina, Juan Carlos, Margarita, Roxana, María Alejandra, Luis, Mario, Horacio, Ignacio, Marianela, Isabel, Cecilia, Roberto, Daniel, Alejandra, etc.) por el compañerismo con el cuál me brindaron en estos años.

A los colegas del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral CONICET/UNL, en especial al Grupo de Morfología y Anatomía Vegetal, Suelos y Biotecnología FCA por el apoyo, el compañerismo y amistad a mi concedidos (Juan Carlos, Andrea, Alicia, Ignacio, Silvia, Mariel, Elisa, Julio, Julia, Nora, Vane, etc.) En especial a Dra. Andrea Reutemann, al Dr. Juan Carlos Tivano y la Lic. Alicia Amsler por su colaboración en los análisis anatómicos y apoyo constante y a Silvia y Mariel que en muchas oportunidades me han privilegiado con su cariño y apoyo además de la amistad.

A mi colega de trabajo y marido Dr. Eleodoro Del Valle por la colaboración en este trabajo y principalmente por todo amor, cariño, amistad, compañerismo, que me dan aliento para seguir adelante y por permitirme hacer parte de tu vida. Te amo e te admiro muito meu bem.

A mi hijo Franco por todo el amor, cariño y por llenar mi vida de alegría y felicidad. Mamãe te ama demais filho!

A toda minha família que está no Brasil: meus avós (vovô Édson e vovó Izabel), minha mãe (Ézila), meu pai (Zé), meus irmãos (Eduardo, Elizabete, Izabela e Jackson), meus bisavós (vovô Zé, Vovó Zeni e vó Lidia), minhas tias (Dalila, Lauriza, Joseni, Alzira, Ana, Delvani, Marceli, Maria Helena, Marluci, Norma, Regina, Vandi, Zina) e tios (Dalmi, Marquinhos, Anderson Bell, Luiz, Davi, João, Joel, Silas, José Ronaldo, Jonito, Elias, Chico) por me permitir ir em busca de meus projetos, mesmo que isso implicasse tanta distancia, tanta preocupação e tantas saudades. Obrigada por todo

amor, por todo apoio, por serem meus alicerces, exemplo de vida e por acreditarem que mesmos com minhas limitações poderia chegar aonde cheguei. Obrigada por me darem essa possibilidade. Sei o sacrifício que foi e é pra vocês e sou eternamente grata por isso e por tudo mais que fizeram e fazem por mim. Amo vocês com toda mi alma!

Aos meus primos que cresceram comigo (Mônica, Débora, Cintia, Mauro, Michel, Marcelo, Edecarlos, Marrom, Marcinho, Douglas, Deleon, Bruno e Juninho) e aqueles que eu vi crescer (Matheus, José Antônio, João Pedro, Vinicius, Maria).

A la familia de Eleodoro que para mí no es la familia de mi marido y si mi familia también. Mis suegros (Gloria e Eduardo), los abuelos (Neli y Modesto), mis cuñados-hermanos (Martín, Leo, Cristian, Fabián, Darío, Adrián, Jesús), mis cuñadas-amigas (Gisela, Lili, Dani), mis sobrinos y ahijados (Thiago, Nico y Martina). Los amo y les agradezco por acogerme como una de Uds. y por hacerme quererlos tanto. Amo vocês!

A mis amigas y amigos queridos de cerca (Andrea, Anita y Guido, Belén y Javier, Silvia y Hugo, Norma, Silvi, Ana y Javi, Pablo, José, Guada, Adrián, Vero, Mónica y Carlitos, Norberto, Ana, Sandra, Meli, los del Grupo de Matrimonios del Sagrado Corazón de Jesús, entre tantos otros) y de lejos (Gilmar, Marcela, Marcelo, José Luis, Xande (in memorian), Mário, Magno, Marquito, Jallile, Flávia, Priscila, Michelly, Ginnie, Dimmy, Partelli, Pedro, Thiago, Lele, Dani, Kaly, Claudio, Lane, Marília, Juan Pablo, Fer, Cláudia, Kelly, Vanessa, Patricia, Lú, Jose, Aldrin, Cica, Ju, Bruna, entre tantos otros). Uds. hacen más linda la vida. Me alegra el alma estar con Uds. Muchas gracias por todo lo que compartimos.

A familia Giupponi (Analía, Marcelo, Ale, Rodri, Belén y Juana) por cuidar de mi hijo como a un hijo y por toda la amistad y cariño con los cuáles nos brindan a cada día. Y a todas familias que me acogieron en Alegre - Espírito Santo, Campos - Rio de Janeiro, Lavras - Minas Gerais y Esperanza - Santa Fe.

A Andrea, Mauro y sus familias por todo compañerismo y por todo amor y amistad con las que nos regalan con sus presencias en nuestras vidas.

Un agradecimiento especial a Tito que muy desinteresadamente ha hecho el contacto para que Eleodoro curse su posgrado en Brasil e hizo todo el esfuerzo para que nosotros tengamos la FCA como nuestro actual lugar de trabajo, acogiéndome con todo el cariños y amistad. Gracias por los

abrigos de tus tías y hermanas que me han abrigado en mi primer invierno en Esperanza y por su estimada amistad.

A mis queridos alumnos de grado, posgrado y pregrado que me llenan a menudo de satisfacción y alegría. Disfruto muchísimo en trabajar con Uds.

A todos Uds. agradezco inmensamente y por favor sepan perdóname por mi ausencia en tantos momentos que no hemos podido estar juntos, pero tengan la plena certeza que ustedes estuvieron y estarán siempre en mis pensamientos y en mi corazón.

“De fato, o Senhor fez grandes coisas por nós, por isso estamos alegres” (Salmos 126:3, B.L.H.).



“Grandes cosas ha hecho el Señor con nosotros por eso estamos alegres” (Salmos 126:3, B.L.A.).

CONTENIDO

| | |
|--|-------|
| Dedicatoria..... | I |
| Agradecimientos..... | II |
| Índice..... | VII |
| Índice de figura..... | XI |
| Índice de tablas..... | XIV |
| Abreviaturas..... | XVI |
| Publicaciones y jornadas en las cuáles fueron presentados, hasta la fecha, los resultados obtenidos en este trabajo..... | XIX |
| Financiamientos recibidos para la ejecución de este trabajo..... | XX |
| Resumen..... | XXI |
| Abstract..... | XXIII |

| | |
|---|----------|
| INTRODUCCIÓN GENERAL..... | 1 |
| 1. Importancia de <i>Prosopis alba</i> Griseb y de su implantación comercial..... | 2 |
| 2. Descripción del Árbol y Caracteres Culturales..... | 4 |
| 3. Distribución Geográfica..... | 5 |
| 4. Principales Usos..... | 7 |
| 5. Requerimientos de su Cultivo..... | 9 |
| 6. Propagación de <i>Prosopis alba</i> | 14 |
| 7. Silvicultura Clonal..... | 15 |
| 8. Propagación Vegetativa: Propagación Clonal..... | 18 |
| 8.1. Utilización e Importancia en el Área Forestal..... | 18 |
| 8.2. Técnicas de Propagación Vegetativa o Clonal..... | 21 |
| 8.2.1 Macropropagación..... | 23 |
| 8.2.1.1. Macropropagación Monoclonal y Multiclonal..... | 23 |
| 8.2.1.2. Macropropagación Monoclonal a Través de Técnicas de Estacas y Miniestacas..... | 24 |
| 8.2.2. Micropropagación: Cultivos de Tejidos Clásicos y Bioreactores..... | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 8.2.3. Macropropagación y Micropropagación: Técnica de Microestacas..... | 27 |
| 9. Factores que Afectan el Enraizamiento..... | 28 |
| 9.1. Factores Internos: | 28 |
| 9.1.1. Especie o Clon..... | 29 |
| 9.1.2. Condiciones de la Planta Madre..... | 29 |
| 9.1.3. Edad y Localización del Propágulo..... | 30 |
| 9.1.4. Hidratos de Carbono y Nitrógeno..... | 30 |
| 9.1.5. Estado Fisiológico..... | 31 |
| 9.1.6. Concentración Endógena de Hormonas Vegetales en el Propágulo Vegetativo.... | 33 |
| 9.2. Factores Ambientales:..... | 35 |
| 9.2.1. Época del Año..... | 35 |
| 9.3. Tratamientos para Inducción del Enraizamiento..... | 37 |
| 9.3.1. Tratamientos Mecánicos para Inducción del Enraizamiento..... | 37 |
| 9.3.2. Tratamientos Fisiológicos para Inducción del Enraizamiento..... | 37 |
| 9.3.2.1. Rejuvenecimiento y Recuperación del Vigor..... | 38 |
| 9.3.2.2. Etiolación..... | 39 |
| 9.3.2.3. Aplicación de Reguladores de Crecimiento..... | 40 |
| 10. Técnica de Miniestacas..... | 42 |
| 11. Aspectos Anatómicos..... | 45 |
| 12. Importancia del Trabajo..... | 47 |
| 13. Hipótesis..... | 48 |
| 14. Objetivos..... | 49 |
| 14.1. Objetivos Generales..... | 49 |
| 14.2. Objetivos Específicos..... | 49 |
| 14.2. Estructura del Trabajo..... | 51 |
| CAPÍTULO 1: ENRAIZAMIENTO DE MINIESTACAS DE PROSOPIS ALBA..... | 52 |
| Resumen..... | 53 |
| I. Introducción..... | 55 |
| II. Materiales y Métodos..... | 57 |

| | |
|----------------------------------|----|
| III. Resultados y Discusión..... | 63 |
| IV. Conclusiones..... | 76 |

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 2: INFLUENCIA DE LA ÉPOCA DEL AÑO EN EL ENRAIZAMIENTO DE MINIESTACAS DE PROSOPIS ALBA..... | 77 |
| Resumen..... | 78 |
| I. Introducción..... | 79 |
| II. Materiales y Métodos..... | 83 |
| III. Resultados y Discusión..... | 87 |
| IV. Conclusiones..... | 98 |

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 3: ASPECTOS ANATÓMICOS DE MINIESTACAS Y ESTACAS DE PROSOPIS ALBA Y SU RELACIÓN CON LA CAPACIDAD DE ENRAIZAMIENTO..... | 99 |
| Resumen..... | 100 |
| I. Introducción..... | 101 |
| II. Materiales y Métodos..... | 102 |
| III. Resultados..... | 105 |
| IV. Discusión..... | 114 |
| V. Conclusiones..... | 117 |

| | |
|---|------------|
| CAPÍTULO 4: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS PLANTAS MADRES DE PROSOPIS ALBA..... | 118 |
| Resumen..... | 119 |
| I. Introducción..... | 120 |
| II. Materiales y Métodos..... | 123 |
| III. Resultados y Discusión..... | 130 |
| V. Conclusiones..... | 136 |

| | |
|---|------------|
| DISCUSIÓN GENERAL..... | 137 |
| CONCLUSIONES GENERALES..... | 140 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 143 |
| | |
| ANEXO I: ASPECTOS DE LA CARACTERIZACIÓN CINÉTICA E ISOENZIMÁTICA DE PEROXIDASAS EN MINIESTACAS Y ESTACAS DE PROSOPIS ALBA..... | 174 |
| I. Objetivo..... | 175 |
| II. Materiales y Métodos..... | 175 |
| III. Resultados Preliminares y Discusión..... | 176 |
| IV. Conclusiones Preliminares..... | 179 |
| V. Referencias Bibliograficas..... | 179 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.- Regiones fitogeográficas de Argentina..... | 6 |
| Figura 2.- Técnicas de propagación vegetativa de especies leñosas..... | 22 |
| Figura 1.1.- Plantas madres de <i>Prosopis alba</i> en Jardín y Minijardín clonal..... | 58 |
| Figura 1.2.- Minijardín clonal: Implantación y Manejo | 60 |
| Figura 1.3.- Efecto de la concentración de IBA sobre número de hojas y foliólulos por plantín clonal de <i>P. alba</i> , a los 40 días posteriores a la inducción del enraizamiento, producidos a través de miniestacas..... | 66 |
| Figura 1.4.- Efecto de la concentración de IBA sobre número de raíces por plantín clonal de <i>P. alba</i> , a los 40 días posteriores a la inducción del enraizamiento, producidos a través de miniestacas..... | 67 |
| Figura 1.5.- Efecto de la concentración de IBA sobre Peso de materia fresca de raíces por plantín clonal de <i>P. alba</i> , a los 40 días posteriores a la inducción del enraizamiento, producidos a través de miniestacas..... | 68 |
| Figura 1.6.- Efecto de la concentración de IBA sobre Longitud total de raíces por plantín clonal de <i>P. alba</i> , a los 40 días posteriores a la inducción del enraizamiento, producidos a través de miniestacas..... | 69 |
| Figura 1.7.- Efecto de la concentración de IBA sobre diámetro de los plantínes clonales de <i>P. alba</i> , a los 40 días posteriores a la inducción del enraizamiento, producidos a través de miniestacas..... | 70 |
| Figura 1.8.- Plantín clonal de <i>P. alba</i> , propagado a través de la técnica de miniestacas, 45 días posteriores a la inducción de enraizamiento. Él plantín representa los parametros de | |

| | |
|---|-----|
| calidad de plantín promedio de los ensayos realizados por la técnica de miniestacas..... | 72 |
| Figura 1.9.- Miniestacas de <i>Prosopis alba</i> en Cámara de Enraizamiento..... | 73 |
| Figura 1.10.- Cuantificación de sistema radical de plantines clonales de <i>P. alba</i> , propagados a través de la técnica de miniestacas..... | 74 |
| Figura 1.11.- Flujograma de producción de plantines clonales a través de la técnica de miniestacas para la implantación de forestaciones clonales..... | 75 |
| Figura 2.1.- Efecto de la época del año (otoño y primavera) sobre la supervivencia de miniestacas de <i>P. alba</i> , a 40 días posterior a la inducción del enraizamiento, con diferentes concentraciones de IBA..... | 88 |
| Figura 2.2.- Región basal de las miniestacas de <i>P. alba</i> en primavera (A, B) y en otoño (C y D)..... | 95 |
| Figura 2.3.- Efecto de la concentración de IBA sobre los parámetros de calidad de plantines clonales de <i>Prosopis alba</i> originados en primavera a los 40 días posteriores a la inducción del enraizamiento. | 97 |
| Figura 3.1.- Brote rejuvenecido de planta madre del minijardín clonal de <i>P. alba</i> de los cuales se extrajeron propágulos para preparación de miniestacas. A y B: Corte transversal de entrenudo de la región apical. C y D: Región media del brote; E y F: Región basal del brote..... | 109 |
| Figura 3.2.- Miniestacas de <i>P. alba</i> año 1. A: Corte transversal de entrenudo de miniestaca antes de iniciar los ensayos de enraizamiento; B: Detalle ampliado de A; C: Miniestaca enraizada; D: Detalle ampliado de C..... | 111 |
| Figura 3.3.- Variaciones en los grados de lignificación del anillo esclerenquimático de miniestacas y estacas de <i>P. alba</i> . A: Miniestaca del año 1 que no enraizó; B: Estaca del año 1, con mayor grado de lignificación, que no enraizó; C: Miniestaca del año 1, con menor | |

grado de lignificación, que enraizó y que presentó mayor producción de raíces a los 40 días; D: Miniestaca del año 1 con mayor grado de lignificación, que enraizó pero que presentó baja producción de raíces a los 40 días; E: Grado de lignificación de miniestaca del año 2, crecida en mayor condición de etiolación y que presentó 99,6 % de enraizamiento..... 113

Figura 4.1.- Imágenes del revelado del gel amplificado por PCR de clones de *Prosopis alba* con el primer Mo09 con 86,4 % de los genotipos amplificados en este gel..... 131

Figura 4.2.- Dendrograma obtenido por análisis cluster (UPGMA), basado en el coeficiente de similitud genética de DICE. Se resaltan valores de bootstrap mayores a 67%. Carácter: Capacidad de enraizamiento..... 134

Figura 4.3.- Revelado del gel Zimograma de los loci ADH y representación esquemática de los fenotipos observados en el zimograma..... 135

Figura A.1.- Fig. A.1.- Cuantificación de Peroxidasas de miniestacas de *Prosopis alba* que presentaron mayor capacidad de enraizamiento..... 177

Figura A.2.- Cuantificación de Peroxidasas de miniestacas de *Prosopis alba* que presentaron mayor capacidad de enraizamiento..... 178

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla 1.1.- Descripción de los promedios de diámetro a la base del tallo, altura y número de brotes de las plantas madres y de los promedios de diámetro a la base del tallo y altura de los brotes de las plantas madres del Minijardín Clonal y Jardín Clonal en la fecha de la colecta de materiales vegetales para la preparación de las miniestacas y estacas..... | 59 |
| Tabla 1.2.- Porcentaje de enraizamiento y supervivencia de estacas y miniestacas de <i>Prosopis alba</i> tratados con diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (IBA)..... | 64 |
| Tabla 2.1.- Promedios de los datos meteorológicos registrados en los ensayos de enraizamiento de <i>Prosopis alba</i> en las distintas épocas del año (primavera y otoño)..... | 86 |
| Tabla 2.2.- Porcentaje de enraizamiento de miniestacas de <i>Prosopis alba</i> a los 40 días posteriores a la inducción del enraizamiento, en diferentes épocas y tratadas con diferentes concentraciones de IBA. | 89 |
| Tabla 2.3.- Influencia de la época del año sobre la altura y diámetro de miniestacas de <i>Prosopis alba</i> a los 40 días posteriores a la inducción al enraizamiento, tratadas con diferentes concentraciones de IBA..... | 93 |
| Tabla 3.1.- Porcentajes de supervivencia y enraizamiento (ENR) en los ensayos de miniestacas y estacas en los años 1 y 2. | 107 |
| Tabla 4.1.- Tabla 4.1.- Secuencias pares de bases..... | 124 |
| Tabla 4.2.- Protocolo PCR microsatélites, con un Mix para volumen final de 15 ul/muestra..... | 125 |
| Tabla 4.3.- Datos de temperatura y ciclos de los primers cargados en el termociclador..... | 126 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 4.4.- Buffers de electrodo I: Tris/Ácido cítrico pH 7.0..... | 128 |
| Tabla 4.5.- Buffers de electrodo II: Poulik. Ac. Bórico /Na(OH) pH 8.2..... | 128 |
| Tabla 4.6.- Buffer III. Tris/Ácido cítrico pH 7.0 dilución 1:5..... | 129 |
| Tabla 4.7.- Buffer IV. Tris/Ácido cítrico pH 8.7..... | 129 |
| Tabla 4.8.- Matriz construida en base de los resultados originados de los análisis de microsatélites. Grupo 1: clones que presentaron mayor capacidad de enraizamiento en los ensayos de viabilidad de la técnica de miniestacas..... | 132 |
| Figura 4.9.- Matriz construida en base de los resultados originados de los análisis de microsatélites..... | 133 |
| Tabla A.1.- Material muestreado para determinación de enzimas peroxidasas (POXs)..... | 176 |

ABREVIATURAS

A: ampere

ABA: ácido abscísico

Abracave: Associação Brasileira de Florestas Renováveis

Abraf: Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas

Act Enz: actividad enzimática

ADH: alcohol deshidrogenasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

AfoA: Asociación Forestal Argentina

ALT: altura

ANA: ácido naftalenacético

ANOVA: análisis de la varianza

ARN: ácido ribonucleico

Buffer: solución reguladora

ce: casquete de esclerénquima

cm⁻²: por centímetro cuadrado

cm año⁻¹: centímetro por año

cm³ L⁻¹: centímetro por litro

col.: colaboradores

Com. Pers.: comunicación personal

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

cv: cambium vascular

DIÁM: diámetro

dm⁻³: por decímetro cúbico

EE: error estándar

ENR: enraizamiento

FCA: Facultad de Ciencias Agrarias

Fig.: figura

F: forward (hacia adelante)

fl: floema
h: horas
ha⁻¹: por hectárea
HCL: ácido clorhídrico
IBA: ácido indolbutírico
ICA: incremento corriente anual
IMA: incremento medio anual
INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
J: joule
KOH: hidróxido de potasio
K₂O: óxido potásico
Kcal: kilocalorías
Kg/cm⁻²: kilogramo por centímetro cuadrado
Kg dm⁻³: kilogramo por decímetro cúbico
Kg m⁻³: kilogramo por metro cúbico
M: molar
m⁻²: por metro cuadrado
m⁻³: por metro cúbico
m³ ha⁻¹ ano⁻¹: Metros cúbicos por hectárea por año
mA: miliampere
MAGyP: Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca de la Nación
mg L⁻¹: miligramo por litro
mJ m⁻²: milijoule por metro cuadrado
mol L⁻¹: mol por litro
mol m⁻² s⁻¹: mol por metro cuadrado por segundo
µm: micrómetro
µE: microeinstein
Nº: número
N Totales.: Nitrógeno totales
ng: nanogramo
p: periciclo

PAR: radiación fotosintéticamente activa
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PER: peroxidasa
P₂O₅: pentóxido de fósforo
POXs: enzimas peroxidadas
pr: primordio radical
p-valor: valor de probabilidad
pie⁻²: por pie cuadrado
pie² h⁻¹: pie cuadrado por hora
r: coeficiente de correlación lineal
R: Reverse (inverso)
rec: región entre casquetes de esclerénquima
Resol.: resolución
rfl: radio floemático
s: segundos
SSR: secuencias simples repetidas de ADN
S.A.: sociedad anónima
sp.: especie
spp.: especies
SUPERV: Supervivencia
TIR: tasa interna de retorno
t: toneladas
t ha⁻¹ año⁻¹: toneladas por hectárea por año
Tris: tris (hidroximetil) aminometano
UNL: Universidad Nacional del Litoral
US\$: dólares
var.: variedad
v: volumen
xl: xilema

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis han sido difundidos parcialmente a través de las siguientes publicaciones y jornadas:

Souza, J.C.A.V. de; Bender, A.G.; Tivano, J.C.; Barroso, D.G.; Mroginski, L.A.; Vegetti, A.C. y Felker, P. (2014) Rooting of *Prosopis alba* mini-cuttings. *New Forests*, Springer Netherlands, 45: 745 – 752. DOI: 10.1007/s11056-014-9429-5.

Souza, J.C.A.V. de; Bender, A.G.; Tivano, J.C.; Barroso, D.G.; Mroginski, L.A.; Vegetti, A.C. y Felker, P. (2013) Propagación vegetativa de *Prosopis alba* a través de la técnica de miniestacas. 4° Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano, Puerto Iguazú, Misiones, Argentina, 23 al 27 de Septiembre de 2013. Presentación oral. Trabajo completo. Disertante: Souza, J.C.A.V. de. AFOA: PONENCIAS PRESENTADAS EN EL CONGRESO. ISSN 1669-6786. Disponible en:

http://www.congresoforestal.org.ar/ponencias/presentaciones_orales/43.pdf

Souza, J.C.A.V. de; Bender, A.G.; Tivano, J.C.; Barroso, D.G.; Mroginski, L.A. y Vegetti, A.C. (2013) Efecto de la etiolación en la propagación vegetativa de *Prosopis alba* (Fabaceae) y su relación con la anatomía de los propágulos. 4° Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano, Puerto Iguazú, Misiones, Argentina, 23 al 27 de Septiembre de 2013. PONENCIAS PRESENTADAS EN EL CONGRESO. ISSN 1669-6786. AFOA. Disponible en:

http://www.congresoforestal.org.ar/ponencias/presentaciones_poster/439.pdf

Souza, J.C.A.V. de; Vegetti, A.C.; Gariglio, N.; Perreta, M.; Bouzo, C.; Bender, A.G.; Temporelli, D.; Reutemann, A.G.; Candiotti, M.A.; Ruchesi, J.; Barroso, D.G.; Cardozo, F.; Ulmari, J.P. y Chiaruli, C. (2014) Propagación clonal de especies forestales de interés ambiental económico y social a través de la técnica de miniestacas. Jornada de Proyectos

CAI+D ORIENTADOS A PROBLEMAS SOCIALES Y PRODUCTIVOS (UNL).
Disertante: Souza, J.C.A.V. de. Santa Fe, Santa Fe.

Tivano, J.C.; Souza, J.C.A.V. de y Vegetti, A. (2011) Desarrollo y estructura del anillo de esclerénquima en miniestacas y plantines clonales de *Prosopis alba* (Fabaceae). In: Resúmenes del XXXIII Jornadas Argentinas de Botánica, Posadas, Misiones, 7 al 10 de octubre de 2011.

Esta Tesis ha sido financiada por los siguientes Proyectos:

Propagación clonal de especies forestales de interés ambiental económico y social a través de la técnica de miniestacas. Directora: Jonicélia Cristina Araújo Vieira de Souza. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral. Subsidiado por CAI+D ORIENTADOS A PROBLEMAS SOCIALES Y PRODUCTIVOS - UNL. Período: Mayo de 2013 hasta mayo de 2015, con solicitud de prórroga hasta mayo 2016.

Proyecto incluido en el Banco Nacional de los Proyectos de Desarrollo Tecnológico y Social (PDTS) del Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación (MINCYT).

Estudio de la Rizogénesis en la Propagación Vegetativa Monoclonal de *Prosopis alba* (Algarrobo blanco). Director: Juan Carlos Tivano, Co-directora: Jonicélia Cristina Araújo Vieira de Souza. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral. Subsidiado por CAI+D PI - UNL. Período 2013-2015.

Validación de la técnica de miniestacas para la propagación vegetativa del algarrobo blanco (*Prosopis alba* Grisebach). Director: Julio Giavedoni, Co-directora: Jonicélia Cristina Araújo Vieira de Souza. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral. Subsidiado por Proyectos I+D+i Secretaría de Estado de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Provincia de Santa Fe. Período: 2009 - 2010.

RESUMEN

El algarrobo blanco (*Prosopis alba* Grisebach) es una especie de gran importancia en la composición arbórea de zonas áridas y semiáridas de Sudamérica, de donde es nativa y de América del Norte, África y Asia. Posee un gran potencial para la producción de materiales forestales, que son tradicional e intensivamente empleados. Actualmente la especie es propagada comercialmente a través de semillas, sin embargo este método de propagación genera una gran variabilidad genética en las plantaciones comerciales, presentando características indeseables a la producción comercial. Por eso existe un gran interés en obtener tecnologías de propagación clonal de la especie. La propagación vegetativa de especies forestales, asociada a programas de mejoramiento, tiene como finalidad acelerar el crecimiento, aumentar la productividad y uniformidad de los plantíos comerciales. El principal objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad de la propagación vegetativa a través de la técnica de miniestacas y el efecto del ácido indolbutírico (IBA) en las concentraciones de 0, 3000, 4500, 6000 y 7500 mg L⁻¹ sobre el enraizamiento de clones de *P. alba*. Se logró el enraizamiento de 98 a 100% de miniestacas en las concentraciones testadas. Al aumentar la concentración de IBA se observó un incremento en el número de hojas y foliólulos de los plantines clonales, como así también, del número, longitud y peso de materia fresca de raíces hasta alcanzar su concentración óptima.

Paralelamente, se realizó la propagación a través de estacas convencionales de jardín clonal a campo, bajo las mismas condiciones de enraizamiento con el objetivo de comparar la eficiencia de las dos técnicas de propagación. Se observó mayor porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de las miniestacas en relación a las estacas.

Se efectuó también un análisis de correlación entre características de las plantas madres (altura, diámetro, número de brotes) y de los propágulos (altura, diámetro) y se observó correlación positiva entre las plantas madres y los propágulos en el enraizamiento como en la altura de los brotes con: la longitud total de raíces, número de foliólulos y altura de los plantines clonales.

El trabajo también tuvo como objetivo evaluar el efecto de la época del año en el enraizamiento de miniestacas de *P. alba*.

Estudios anatómicos fueron realizados para evaluar el efecto del grado de lignificación en enraizamiento de propágulos y la presencia o no de barreras mecánicas y la influencia de las mismas en el enraizamiento.

Se propone a la técnica de miniestacas como una herramienta para la clonación de *P. alba*.

Palabras clave: Silvicultura clonal, Algarrobo blanco, Enraizamiento, Propagación vegetativa.

ABSTRACT

Mesquite (*Prosopis alba* Grisebach), an important species in arid and semiarid regions of where is native to South America and North America, Africa and Asia, is currently commercially propagated by seeds, however this method of propagation generates a large genetic variability in commercial plantations, introducing undesirable to commercial production characteristics. So there is great interest in developing techniques for clonal propagation of species. The main objective of this work was to evaluate vegetative propagation using the mini-cutting technique and indolebutyric acid (IBA) at different concentrations (0, 3000, 4500, 6000 and 7500 mg L⁻¹) on rooting of *P. alba* clones. Rooting was achieved in 98-100% of the mini-cuttings at all concentrations tested. Increasing the concentration of IBA the observed an increase in the number of leaves and leaflets of clonal seedlings, as well, fresh matter weight and in number and length of roots to reach its optimum concentration. Plants were also vegetatively propagated in the field via conventional clonal garden cuttings under the same rooting conditions to compare the efficiency of the two propagation techniques. Higher percentage of rooting and survival of minicuttings was observed in relation to cuttings. A correlation analysis conducted between characteristics of stock plants (height, diameter, number of shoots) and shoots (height, diameter) showed a positive correlation between rooting and height of shoots with total root length, leaflet number, and height of clonal seedlings. The work also aimed to evaluate the effect of season on rooting miniestacas *P. alba*. Anatomical studies were performed to evaluate the effect of lignification in rooting of propagules and the presence or absence of mechanical barrier and the influence thereof on rooting. We propose the mini-cutting technique as a tool for the *P. alba* cloning.

Key words: Clonal forestry, Mesquite, Rooting, Vegetative propagation

INTRODUCCIÓN GENERAL



1. Importancia de *Prosopis alba* y de su Implantación Comercial

Prosopis alba Griseb. es una especie de la familia Leguminosae de gran importancia en la composición arbórea de zonas áridas y semiáridas (Felker y col., 2008), no solamente de Sudamérica de donde es nativo pero también tiene importancia en la composición arbórea de regiones áridas y semiáridas de de varios lugares en el mundo, cómo por ejemplo regiones de America del Norte, África, Asia y Australia. Tiene destacada importancia en Méjico y E.U.A. (principalmente en Arizona, con énfasis en la ciudad de Phoenix), también en algunas regiones de África como por ejemplo África del Sur y Túnez (desierto del Sahara, norte de África). La especie inclusive podría ser cultivada en varias regiones áridas y semiáridas del mundo como Kenia, Etiopía, entre otros. Se trata de una especie de gran potencial para la producción de material forestal (Ewens y Felker, 2010), y la de mayor importancia económica dentro del género (Giménez y col., 1998; Galera, 2000). Tradicional e intensivamente empleada en el uso de madera para muebles, construcción y carpintería, producción de leña y carbón, alimentación animal en sistemas silvopastoriles y en la alimentación humana. Es una especie importante fijadora de nitrógeno (Giménez y col., 1998; Galera, 2000; Felker y col., 2001; Felker y Guevara, 2003; Ewens y Felker, 2010).

Actualmente este recurso proviene principalmente de áreas naturales, a través de la explotación intensiva de los montes nativos (Patch y Felker, 1997). Debido a ésto, hay un gran interés en obtener tecnologías de domesticación, mejoramiento y propagación de esta especie nativa (Verzino y col., 2003; Verga y col., 2005).

Además existe un aumento creciente del interés en la forestación de regiones áridas y semiáridas con especies altamente productivas, resistentes a la sequía y a la salinidad como *Prosopis alba*. Es por ello que varias técnicas de clonación para propagar estos materiales han sido desarrolladas (Arce y Balboa, 1991; Arce y col., 1990).

La implantación de especies forestales de producción tiene destacada importancia en la disminución del déficit forestal de productos madereros para aserrado y biomasa forestal para producción de energía - bioenergía (Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas - ABRAF, 2013; Dirección de Forestación – Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca de la Nación - MAGyP, 2008). Además contribuye a la protección de los montes nativos (Associação Brasileira de Florestas Renováveis - ABRACAVE, 2001; Asociación Forestal Argentina - AFOA, 2012), que son todavía los que en la última década han provisto y proveen de material a algunos de los principales sectores del consumo forestal, como los de aserradero y bioenergía (Primer Inventario Nacional de Bosques Nativos: Informe Regional Parque Chaqueño, 2007).

Conjuntamente es necesario remarcar que las forestaciones tienen otro rol importante y extremadamente destacado en la fijación del carbono, principal responsable por el efecto invernadero (Alfnas y col., 2004; AFOA, 2012). Las forestaciones también contribuyen en la regulación del ciclo hidrológico, protección de los suelos (AFOA, 2012) y mantenimiento de la biodiversidad, entre otros.

Además de su importancia económica y ambiental las forestaciones poseen una gran importancia social (AfoA, 2012), dado que al aumentar las ganancias del productor, generan una mejor calidad de vida, posibilitando la radicación del productor en el campo y contribuyendo al crecimiento de la economía local y/o regional. Sumado a esto, las forestaciones de *P. alba* pueden ser producidas en áreas marginales de baja renta y baja productividad y/o inaptas para la agricultura (suelos salinos y/o inundables con desagüe, con sequías, heladas, etc.).

Por lo mencionado anteriormente resulta necesaria la implantación de esta especie, tanto para la protección del monte nativo como también para la producción. Para ello se requiere de producción comercial de plantines, en escala y de alta calidad para contribuir con los productores interesados en llevar adelante este tipo de forestación.

2. Descripción del Árbol y Caracteres Culturales

Árbol medianamente grande y muy coposo, presentando hasta 18 m de altura y 1,50 m de diámetro. De corteza delgada, de color gris a castaño-violáceo con surcos longitudinales oblicuos, poco pronunciados. Hojas compuestas, bipinadas, 1-3 pares de pinas de 6 hasta 12 cm de longitud; 16-35 pares de foliólulos opuestos, en general sin foliólulo impar terminal; pares de foliólulos insertos de 1,5 a 4 mm de distancia entre sí; foliólulos lineal-oblongos, subagudos, con nervio medio apenas visible y base algo oblicua; miden 5 a 15 mm de longitud por 1 a 1,8 mm de anchura. A menudo presentan espinas axilares geminadas en la base de las hojas. Inflorescencia en espiga; flores blanco-amarillentas (Tortorelli, 2009).

El fruto es descripto como lomento drupáceo, vaina indehisciente septada. Los artejos presentan contorno con forma de paralelogramo más o menos deformado y están estrechamente alineados formando una cinta, lo que difiere de los algarrobos negros (*Prosopis nigra* Griseb.) que poseen los frutos arrosariados definidos por una mayor separación entre los artejos de forma lenticular. Otra diferencia entre los frutos de los algarrobos negros y de los algarrobos blancos es que éstos últimos presentan el endocarpo generalmente delgado (0,15 a 0,25 mm) mientras los primeros poseen endocarpo grueso (1,2 a 1,5). La semilla posee comúnmente forma ovoide aplanada (Burkart, 1943).

Los frutos alcanzan su madurez en el mes de noviembre, diciembre, enero o febrero según latitud y longitud. Ello ocurre hacia fines de noviembre en la zona norte del país, de baja altitud; en tanto que en el límite de dispersión sur (a mayor latitud) la maduración se produce hacia finales de febrero. En una misma zona puede haber hasta 20 días de diferencia en la maduración entre rodales o individuos. La floración puede servir de indicador para la maduración de los frutos, dado que ésta se produce dos meses después de la floración (Verzino y Joseau, 2005).

Especie marcadamente heliófila y mesoxerófila a xerófila; crece generalmente diseminada y en forma aislada adquiriendo entonces la copa semejanza con una

sombrilla, a veces un tanto irregular. Su tronco es más bien torcido, produciendo por ello rollizos de escasa longitud en relación al fuste. Se trata de un árbol frugal, longevo, y de crecimiento medio; se regenera por vía sexual y también produce retoños (brotes de cepa) (Tortorelli, 2009).

Respecto a los caracteres físico-mecánicos es importante mencionar que *P. alba* posee una madera pesada a moderadamente pesada, y su densidad resulta superior al promedio, aproximadamente entre 750 y 850 Kg m⁻³ (0,75 a 0,85 Kg-dm⁻³); mientras que su dureza es de 770 Kg cm⁻². La concentración en porcentaje corresponde a: radial 2,1; tangencial 2,8; volumétrica 8,2. La flexión en Kg cm⁻² corresponde a: tensión al límite proporcional 304; módulo de rotura 643; módulo de elasticidad 62.000. La compresión axial en Kg cm⁻² corresponde a: tensión al límite proporcional 320; módulo de rotura 598 (Felker y Guevara, 2003; Tortorelli, 2009).

Valores bajos de contracción y casi similares contracciones radiales y tangenciales son probablemente las mejores medidas de estabilidad de la madera, y una de las más importantes características en la fabricación de muebles. Es por ello que el algarrobo está técnicamente al nivel de las mejores especies del mundo para la fabricación de muebles (Felker y Guevara, 2003).

3. Distribución Geográfica

Prosopis alba se encuentra principalmente en áreas planas subtropicales de Argentina, Uruguay y Paraguay. Está presente también en forma de manchones en las zonas semiáridas de Bolivia y Perú (Verzino y Joseau, 2005).

En Argentina es una especie muy abundante y está distribuida en la zona centro y norte del país (Fig. 1). Abarca una larga extensión que corresponde a las regiones fitogeográfica del Parque Chaqueño y del Espinal, (Primer inventario Nacional de Bosques Nativos: Informe Regional Parque Chaqueño (2007) e Informe Regional

Espinal (2007)). Ha sido citada para Córdoba, San Luis, Catamarca, La Rioja, Santiago del Estero, Chaco, Formosa, Salta, Jujuy, Tucumán y Salta (Tortorelli, 2009).

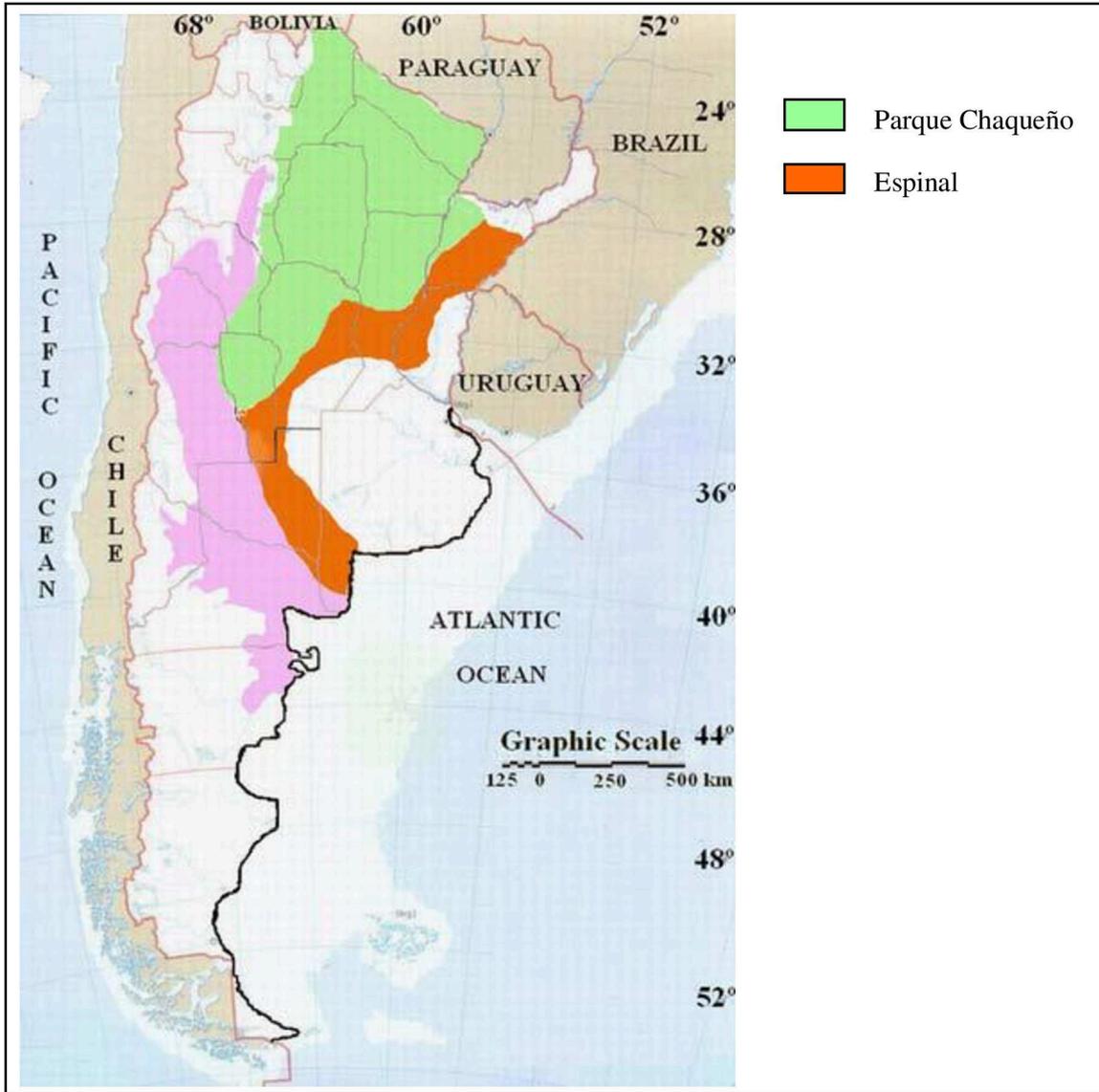


Figura 1.- Regiones fitogeográficas según Cabrera (1976).

4. Principales Usos

El algarrobo blanco produce madera de alto valor; más de 60% de los muebles de algarrobos del país son elaborados con su madera; siendo una de las Mimosoideas argentinas de mayor importancia económica (Giménez y col., 1998; Galera, 2000; Juárez de Galindez y col., 2005).

Su madera, es muy cotizada para muebles, carpintería de obra, parquets, y revestimientos (Juárez de Galindez y col., 2005). Se utiliza en la fabricación de muebles de estilo rústico, pesados y con buen acabado de color oscuro. En la carpintería de obra, se utiliza en la construcción de marcos de puertas y ventanas, parquets, tirantes, bancos de carpintero y escolares, clisés, tarugos, tacos de billar, poleas, porta goma de sellos, hormas de zapatos, y también en la fabricación de productos de carpintería rural, fabricación de mangas, bretes, casillas de operar y construcciones y viviendas rurales, etc. También es comúnmente utilizado para postes y varillas para infraestructura ganadera, así como rodrigones y varrillones para viñas con duración de 15 a 20 años. Se usa para la elaboración de barriles de vino, utensilios, cajas, adornos, entre otras utilidades (Galera, 2000; Tortorelli, 2009).

Su madera posee un excelente veteado y su nobleza permite el procesamiento sin necesidad de secado (Coronel de Renolfi y col., 2012). El algarrobo blanco posee una de las maderas de mayor estabilidad dimensional del mundo, y esta estabilidad combinada con su color marrón rojizo, densidad alrededor de 750 Kg m^{-3} ($0,75 \text{ Kg dm}^{-3}$) y dureza (770 Kg cm^{-2}) satisface todos los requerimientos para ser incluida dentro de las maderas para muebles de interior más finos del mundo (Felker y Guevara, 2003).

Produce combustible de alto poder calorífico, siendo de excelente calidad para leña ($4200 \text{ Kcal kg}^{-1}$), y para carbón vegetal ($6500 \text{ Kcal kg}^{-1}$), con una eficiencia de transformación de 4 a 5 t de leña, lo que equivale a 1 t de carbón (Galera, 2000).

La madera del duramen puede proporcionar de 10 al 12 % de su peso de un extracto tánico de buena calidad, especial para curtir pieles finas a las que otorga consistencia suave y flexible (Tortorelli, 2009).

Los árboles son utilizados como cortinas forestales, montes de abrigo y sistemas silvopastoriles (con pasturas naturales e implantadas) y agroforestales, para explotación de su potencial maderero así como forrajero y apícola (Galera, 2000; Carranza y Ledesma, 2005). Sus frutos constituyen excelente forraje (Tortorelli, 2009), y por su alto valor proteico y energético son también utilizados en la alimentación humana en diversas formas (Galera, 2000; Verga y col., 2005; Tortorelli, 2009). Además es una especie útil para el enriquecimiento del suelo por la fijación de nitrógeno (Felker y col., 2001).

La creciente utilización del algarrobo blanco para los usos antes mencionados, hace que esta especie sea explotada sin tener en cuenta los principios básicos de un aprovechamiento racional y sustentable (Juárez de Galindez y col., 2005).

En la Provincia del Chaco se cosechan anualmente más de 100.000 toneladas de rollizos de *P. alba*, para la industria del mueble. En el sudoeste de Estados Unidos se ha desarrollado una industria creciente de muebles de lujo con precios al por mayor de US\$ 1.600 por m³. Dado que la producción tiene su origen en bosques nativos no manejados ni certificados, resultará importante iniciar plantaciones para garantizar la sustentabilidad de este recurso (Felker y Guevara, 2003), entre otras alternativas para disminuir la presión sobre los bosques nativos.

5. Requerimientos de su Cultivo

La especie crece naturalmente en zonas con precipitaciones anuales que oscilan entre los 500 y 1.200 mm concentradas en el período estival y con temperatura extremas absolutas de 48 °C de máxima y -10 °C de mínima; y en distintos tipos de suelos, especialmente en los franco arenosos, tolerando bajos niveles de salinidad. Soporta anegamientos temporales de 1 a 2 meses y es resistente a las condiciones de aridez. También se encuentra en áreas serranas sobre suelos con pedregosidad manifiesta (aluvionales) hasta los 1.000 m de altitud. En las zonas de menor precipitaciones se comporta como freatófito, encontrándose preferencialmente a orillas de cañadas y en áreas pantanosas, a lo largo de ríos o arroyos, etc. Sus individuos alcanzan mejor desarrollo en zonas con napas freáticas de hasta 15 m de profundidad (Verzino y Joseau, 2005).

Para plantaciones comerciales la indicación para el corte raso del algarrobo blanco es de 25 años, pudiendo ser anticipada o postergada, de acuerdo con las condiciones específicas del área de implantación, del material genético utilizado (semillas de rodales semilleros y/o huerto semillero), de los objetivos y de la necesidad del productor.

El marco de plantación más utilizado actualmente es el de 4 m x 4 m con una densidad de 625 plantas por hectárea. Tal densidad es reconocida por la Ley Nacional 25.080, prorrogada por la Ley 26.432 de Inversiones para Bosques Cultivados que ofrece apoyo económico no reintegrable a la implantación de forestaciones. Otros marcos de plantación también son reconocidos por dicha ley, como los de 3 m x 6 m y hasta 8 m x 2 m en caso de sistemas silvopastoriles. La Ley solicita una densidad mínima de 400 plantas por hectárea para *Prosopis* sp.. Otro marco de plantación utilizada es de 3 m x 3 m, que corresponde a 1.111 plantas por hectárea (Ewens, Com. Pers.).

El Ministerio de Economía y Finanzas Públicas, actualiza periódicamente los costos de implantación de *Prosopis* sp.; estos costos son utilizados por el MAGyP para

la aplicación de la Ley 26.432 de Inversiones para Bosques Cultivados. En la última actualización, bajo la Resol. 415/2013, para las Jurisdicciones de Santa Fe, Chaco, Santiago del Estero, Catamarca, Córdoba, Formosa, La Rioja, Mendoza, San Juan, San Luis, con una densidad de 400 a 499 árboles ha⁻¹, el costo de implantación es de \$9.399,00, con reintegro es de \$7.519,00 para forestaciones de 1 a 300 ha y de \$1.880,00 de 301 a 500 ha. Con la densidad de 500 a más árboles ha⁻¹ el costo de implantación es de \$12.160,00 con un reintegro de \$9.728,00 para forestaciones de 1 a 300 ha y de \$2.432,00 de 301 a 500 ha. Para las jurisdicciones de Salta, Tucumán y Jujuy los valores de implantación son menores.

La Ley 26.432 de Inversiones para Bosques Cultivados, además de financiar la implantación de la especie, también financia las podas, raleos y enriquecimiento de bosques nativos, concediendo además beneficios fiscales. Se destaca que este tipo de forestaciones son una inversión pues para cada peso invertido se recauda un promedio de \$7,00 en impuestos al valor agregado, ganancias y por el desarrollo social que las mismas potencian.

Las plantas se podan a temprana edad, procurando eliminar los estratos de ramificaciones de tal manera que la madera se concentre en un solo eje. Se recomienda podas frecuentes, realizando dos podas por año, a partir del primero año de plantación, durante los 3 a 4 primeros años hasta que se defina un único fuste de al menos 2.5 metros (Ewens, Com. Pers.).

Se recomienda también el “enderezamiento” del tallo. La técnica de “enderezamiento” desarrollada en la Estación Experimental Fernández - Universidad Católica de Santiago del Estero, se usa para posicionar el tallo verticalmente luego de una poda de primavera o verano, y se lo hace en días de mucho calor en los cuáles los tallos se presentan extremadamente maleables, teniendo el tallo de 3 a 4 cm de diámetro y sin desarrollo de duramen (Ewens, Com. Pers.).

Los raleos deben ser realizados cuando las curvas del IMA (Incremento Medio Anual) e ICA (Incremento Corriente Anual) se encuentran, o sea cuando el rodal empieza a estabilizar su crecimiento (Drake y col., 2003). El momento en que se aplica el primer raleo depende de la población inicial del rodal, de las condiciones de manejo y

de la situación del mercado. Desde el punto de vista biológico, los rodales se deben ralear antes de que surjan serias situaciones de competencia entre los árboles. Los raleos se llevan a cabo cuando se puede justificar que una aplicación aumentaría el crecimiento en volumen o los retornos económicos (Daniel y col., 1982). El primer raleo, para una densidad de 3m x 3m es realizado en el quinto año, aproximadamente.

Información técnica adicional existe en las publicaciones generadas por Galera (2000), Ewens y Navall (2006), Senilliani y Navall (2006) y Zarate (2012).

El promedio de productividad de madera de los rodales de *P. alba* es muy variable y actualmente está entre 1 y 13,9 m³ ha⁻¹ año⁻¹, dependiendo de la densidad, manejo y material genético utilizado (desde bosques nativos a bosques cultivados). Alcanzando una productividad 15,4 m³ ha⁻¹ año⁻¹, según el estudio de Felker y Guevara (2003).

Zarate (2012) observó en los primeros cinco años de implantación de algarrobo blanco en la Provincia de Santiago del Estero, con una densidad de 1000 plantas por hectárea y con podas, un crecimiento anual de 4,34 m³ ha⁻¹ ano⁻¹ de volumen total. Pudiendo llegar así a una producción total de biomasa de hasta 100 m³ por hectárea. Y una productividad anual 2,84 m³ ha⁻¹ano⁻¹ de volumen de fuste para aserrado. De esta manera, se logra una producción de hasta 71 m³ de madera aserrada por hectárea.

En el trabajo de Felker y Guevara (2003) se informan tasas de crecimiento del diámetro basal de *P. alba* en Texas y Argentina de 0,41 cm año⁻¹ en bosques nativos y sin manejo (81 años de información), y 2,60 cm año⁻¹ en plantaciones comerciales de material seleccionado (3 años de información; precipitación media anual 734 mm).

Coronel de Renolfi y col. (2012) encontraron para 40 trozas de algarrobo blanco en 10 diferentes aserraderos de la Provincia de Santiago del Estero un volumen total de madera de 9,47 m³, con corteza y un volumen de aserrado de 5,59 m³; lo que indica un rendimiento en madera aserrada del 58 % con corteza, con un tiempo promedio total del proceso de 920 segundos. La productividad se estableció en 232 pie² h⁻¹. El costo directo del aserrado asciende a \$ 2,33 pie⁻².

Los bosques nativos, sin manejo y sin selección, no logran llegar a una TIR del 10% y no son económicamente rentables (Felker y Guevara, 2003). Ésto determina que los mismos deben ser manejados para aumentar el desarrollo económico y social de los productores y/o comunidades donde se encuentran, pero para eso es necesario resaltar la necesidad de capacitación para esos productores y o comunidades. En el trabajo de Felker y Guevara (2003) se detallan las condiciones en las cuales la producción de algarrobo es económicamente rentable, logrando una TIR mayor que 10% (con costo de la tierra incluido). La producción de algarrobo es económicamente rentable en plantaciones provenientes de semillas, con selección y manejo, en áreas con 707 mm de lluvia anual para un precio de US\$ 800 m⁻³ en Argentina y de US\$ 1.600 m⁻³ en Estados Unidos, con rotación de 24 años. En tanto que lo es en áreas con 1.000 mm de lluvia anual para un precio de US\$ 800 m⁻³ en Argentina y Estados Unidos con rotación de 17 años. Sin embargo los autores observaron en este mismo trabajo que la TIR estimada es el doble en plantaciones con clones y con una rotación que se reduciría a 15 años en áreas con 734 mm año⁻¹ de lluvia, y para 11 años en áreas con 1.000 mm año⁻¹ de lluvia, siendo que en estas áreas, con mayor índice pluviométrico la TIR estimada llegaría hasta el triple.

En ensayos en plantaciones de 7 años Ewens y Felker (2010), observaron una productividad superior a 50 Kg planta año⁻¹ comparado con 32 Kg planta año⁻¹ del control (material no seleccionado). Estos datos llevados a una plantación comercial de frutos de algarrobo con selección y mejoramiento genético y con una densidad de 100 plantas/ha, en un marco de plantación de 10 m x 10 m, producirían un promedio de 5 t ha⁻¹ año⁻¹. Existen plantas con una productividad media de 70 Kg planta⁻¹año⁻¹ (Ewens, Com. Pers.), lo que en las mismas condiciones mencionadas anteriormente producirían un promedio de 7 t ha⁻¹ año⁻¹. La clonación de estos árboles altamente productivos sería de sumo interés para la producción de frutos.

Las semillas sufren el ataque de insectos (bruchidos), lo que determina la necesidad de tomar los debidos cuidados en su almacenamiento, recomendándose el procesamiento mecanizado de los frutos a la mayor brevedad posible posterior a la cosecha, así como el almacenamiento que debe ser realizado en envases plásticos, con tapas a rosca o a presión y el secado en estufa de aire circulante a 40°C por 24 horas.

Posteriormente las semillas secas se pueden almacenar en bolsas de tela a una temperatura de 4° y 7°C (Verzino y Joseau, 2005). Para el uso de máquina de trilla de *Prosopis* sp. se recomienda la revisión de los trabajos de Cosiansi y col. (1998) y Verzino y Joseau (2005).

En el trabajo de Ewens y Felker (2010) se informó sobre la presencia de un hongo patogénico del género *Pestalotiopsis* responsable de la caída de hojas en algunos clones, e insectos psílidos (*Prosopidopsylla flava* Burckhardt) responsables de la caída de hojas en otro conjunto de clones. Las plantaciones de *P. alba* son atacadas por una variedad de insectos defoliadores y formadores de agallas que impactan negativamente sobre el crecimiento y la forma de los árboles, particularmente en las primeras etapas de crecimiento (Ewens, Com. Pers.).

La propagación de plantas de *P. alba* resistentes a los insectos-plagas y/o a patógenos que atacan hojas, flores, frutos maduros y/o inmaduros, serían de suma importancia en la producción comercial.

El aprovechamiento racional de los recursos forestales juega un rol importante en el desarrollo económico y social del país (Coronel de Renolfi y col., 2012).

Se resalta, además, la importancia de la implementación de programas de mejoramiento, así como el empleo de la silvicultura clonal, para lograr un aumento considerable en la productividad y calidad de los rodales. Así como para lograr la formación de rodales de características silviculturales de interés comercial para la producción de madera y frutos de esta especie nativa en menor plazo.

6. Propagación de *Prosopis alba*

Actualmente la especie es propagada comercialmente sólo a través de semillas (Ewens, Com. Pers.). El uso de semillas para la producción de plantines para implantación de bosques cultivados presenta características indeseables para la producción comercial, menores tasas de crecimiento y productividad y una gran heterogeneidad del rodal, generado por la alta variabilidad genética. Sin embargo sigue siendo utilizada debido a las dificultades para la obtención de materiales adultos rejuvenecidos y por las dificultades técnicas y operacionales que presenta la propagación vegetativa de esta especie.

Se han realizado numerosos trabajos con el objetivo de lograr una técnica de clonación viable para la comercialización de plantines de clones elites de *P. alba* (De Souza y Nascimento, 1984; Jordan y col., 1985ab; Klass y col., 1985, 1987; De Souza y Felker, 1986; Tabone y col., 1986; Green y col., 1990; Wojtusik y col., 1993; Castillo de Meier y Bovo, 2000; Felker y col., 2005; Felker, 2008; Felker y col., 2008, entre otros mencionados por Arce y Medina, 1997). Sin embargo la técnica más promisoría ha sido a través de injertos según la metodología descrita por Wojtusik y Felker (1993) y evaluada por Ewens y Felker (2003); no obstante hasta la actualidad aún no ha sido llevada a cabo comercialmente. Según Ewens y Felker (2003) a pesar de los avances en el enraizamiento de estacas (que presentan resultados muy variables), aún no hay una técnica de propagación vegetativa monoclonal que sea viable para la producción de grandes cantidades de clones de *P. alba* que serían necesarios para las plantaciones a escala comercial. Estos autores debido a las dificultades en el enraizamiento de los propágulos recomiendan la utilización del injerto en la propagación de esta especie.

A partir de ensayos de progenie de *P. alba* se han seleccionado clones multipropósito con tasas de crecimiento, alta productividad de vainas y vainas altamente palatables, materiales resistente a plagas y/o enfermedades (Felker y col., 2001; Ewens y Felker, 2010), tolerantes a altos índices de salinidad (Ewens y col., 2012). Sin

embargo, la propagación de estos clones a partir de estacas es dificultosa. Hasta la actualidad la propagación de estos materiales se logró a través de la técnica de injerto y mediante ella se hicieron posibles plantaciones injertadas (Ewens y Felker, 2003; Felker y Guevara, 2003; Ewens y col., 2012). Sin embargo esta técnica también presenta dificultades operativas para la producción de plantines clonales a escala comercial.

Es por ello que desde el punto de vista productivo resulta muy conveniente la propagación vegetativa de esta especie. Propagación que requiere ser técnica, económica y operacionalmente viable para lograr la producción de bosques cultivados de elevada productividad y calidad de madera y/o frutos, con características silvícolas de interés, resistentes a plagas y/o enfermedades y adaptados a las diversas condiciones edafo-climáticas.

7. Silvicultura Clonal

El termino técnico “silvicultura clonal” designa al conjunto de técnicas silviculturales adoptado en un programa de implantación y manejo de plantaciones forestales clonales. Abarca todo el proceso de formación de una forestación clonal, desde la selección del árbol superior, la propagación vegetativa, la evaluación de árboles seleccionados en tests clonales, la producción de plantines, el establecimiento y la conducción hasta su cosecha (tala rasa) (Xavier y col., 2013).

Brasil es un país referente en silvicultura clonal de *Eucalyptus* sp. L'Hér. De acuerdo con Teixeira (2001) el uso de la clonación forestal de Eucaliptos en gran escala se inició al final de la década del 70, en la Provincia de Espirito Santo, generada por la heterogeneidad de las plantaciones y por la incidencia de cancro (Alfenas y col., 2009).

El último Anuario Estadístico de la Asociación de productores de forestaciones implantadas de Brasil (ABRAF, 2013) muestra que de los 4,9 millones de hectáreas de forestaciones implantadas de Eucaliptos en el país, 3 millones son clonales.

Resulta fundamental el desarrollo de la silvicultura clonal para la propagación de materiales de interés silvícola para los más variados propósitos comerciales (Alfenas y col., 2004; Souza y col., 2009).

La clonación en la silvicultura clonal posibilita la producción de materiales de alta productividad y de rápido crecimiento (Xavier, 2002; Assis y Mafia, 2007); con una producción de materia prima homogénea y de mayor calidad (Alfenas y col., 2004) y/o tolerantes a frío/calor, sequía, salinidad y con resistencia a plagas (De Souza y Felker, 1986; Felker y col., 2005; 2008; Ewens y Felker, 2010) y/o a enfermedades (Alfenas y col., 2004).

Prosopis alba es una especie alógama, de gran variabilidad (Verzino y Joseau, 2005), que presenta genotipos de interés silvícola (De Souza y Felker, 1986; Felker y col., 2005; Felker y col., 2008; Ewens y Felker, 2010), sería de gran interés desarrollar un programa de silvicultura clonal para la producción comercial de estos materiales.

La clonación de familias es una técnica de propagación vegetativa que consiste en el enraizamiento de miniestacas que tiene sido adoptada a multiplicación de familias seleccionadas (superiores) todavía en la fase juvenil. Esta técnica viene siendo actualmente utilizada por las grandes empresas forestales permitiendo ganancias en tiempo, productividad, calidad y uniformidad de los rodales comerciales (Souza, 2007; Andrejow y Higa, 2009; Xavier y col., 2013a).

En el trabajo de Andrejow y Higa (2009) los autores proponen el uso de la misma técnica empleada en esta tesis para la propagación clonal de *Pinus taeda* L. que es considerada una de las especies de coníferas más difíciles de propagar vegetativamente y actualmente la técnica de clonación de familias superiores viene siendo utilizada comercialmente para la propagación de esta especie (Hamann, 1995; Rocha y Niella, 2002; Xavier y col., 2013).

En Argentina la empresa Alto Paraná S.A., del grupo chileno Arauco, viene utilizando exitosamente la técnica de clonación de familias de materiales juveniles proveniente de semillas de huerto semillero clonal. El uso de la técnica ha posibilitado,

por ejemplo en *P. taeda*, la reducción del turno de corte (tala rasa: cosecha) de 25 años a 13 años y posibilitando también la eliminación de la práctica del raleo.

La técnica también permite aumentar la capacidad de producción de plantines y con un menor costo respecto al uso de la micropropagación y con el uso exclusivo de semillas híbridas.

También en Argentina, la experiencia con macropropagación en *P. taeda* es difundida por la Forestal Bosques del Plata, que produce un millón de plantines provenientes de propagación vegetativa. Los setos (plantas madres) son originados de semillas de las mejores familias de *P. taeda*, obtenidas por medio de cruzamientos controlados y conducidos en macetas, y de los setos son cosechadas las estacas-miniestacas (Pezzutti, 2005).

En Brasil, las primeras tentativas de transferencia de tecnología de producción de plantines de Eucalipto (microestacas y jardín clonal hidropónicos) para la clonación de familias de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (Sénéclauze) W.H.Barrett & Golfari y *P. taeda* fueron realizadas y difundidas por la International Paper (Campinhos y col., 2000) y E. Furlan Consultoria, con la propagación vegetativa para familias de *P. caribaea* var. *hondurensis* (Furlan, 2002). El uso de estas técnicas por las grandes empresas forestales brasileras y argentinas con *Eucalyptus* y *Pinus* entre otras especies de interés y los innumerables trabajos científicos en el área fundamentan lo planteado en este trabajo.

8. Propagación Vegetativa : Propagación Clonal

8.1. Utilización e Importancia en el Área Forestal

La propagación vegetativa, también denominada como propagación clonal o directamente clonación, es utilizada principalmente porque logra un rápido crecimiento, una mayor productividad, adaptación de los clones a los sitios de implantación y producción de materia-prima homogénea (uniformidad de las plantaciones), junto a un costo competitivo. Permite una rápida selección y multiplicación de individuos superiores, tornando a las plantaciones forestales más productivas y uniformes en un plazo más corto, dado que acelera el crecimiento y desarrollo de los individuos clonados (Xavier, 2002; Alfenas y col., 2004; Souza y col., 2009; Xavier y col., 2013). La clonación ha posibilitado la implantación de proyectos de reforestación en áreas hasta entonces no utilizadas (salinas, inundables con y sin desagüe, con sequías, heladas, etc.), dada la limitación de material genético vía semillas para atender a tal propósito y posibilitado la propagación de materiales de características silvícolas específicos, de interés como material de mayor poder calorífico para bioenergía, mejor calidad de madera para aserradero, etc.. Es por ello que se ha incrementado en los últimos años el interés por la propagación vegetativa de especies forestales (Xavier, 2002). Por todas las ventajas de la clonación anteriormente mencionadas actualmente la gran mayoría de las plantaciones comerciales provienen de plantines clonales (Tonello, 2004).

La propagación vegetativa es posible debido a la totipotencia, que es la capacidad que poseen células, parte de órganos u órganos de regenerar órganos o plantas completas, a través de la reproducción somática (reproducción asexual o vegetativa), basada exclusivamente en la mitosis (Xavier y col., 2013).

La utilización forestal de la clonación es amplia y va desde la producción a gran escala de plantas mejoradas de materiales puros o híbridos hasta la obtención de la

floración precoz de plantas destinadas a la producción de frutos y semillas (Xavier y col., 2013).

Para la utilización adecuada de la clonación es necesario tomar cuidados para que no ocurra la reducción de la base genética y de la segregación genética en plantines provenientes de huertos instalados por estacas o injertos de híbridos (Brune, 1982).

Para algunas especies forestales cultivadas del género *Eucalyptus*, hay conocimiento científico suficiente para la implementación del proceso productivo de plantines forestales a través del clonado (Xavier, 2002). Sin embargo, eso no ocurre para un gran número de especies forestales de interés, en las que se necesita del desarrollo y/o ajuste de técnicas para el proceso de producción de plantines (Galera, 2000; Verzino y col., 2003; Xavier y col., 2003b; Ventín y col., 2006; Souza y col., 2009).

Además de los eucaliptos, otras especies exóticas se propagan vegetativamente, como el Cedro australiano (*Toona ciliata* M. Roem), con la finalidad de sobreponer los problemas inherentes a propagación por semillas, permitir la rápida selección y producción de individuos superiores tornando a las plantaciones más productivas, más uniformes y lográndolas en un menor tiempo (Souza, 2007; Souza y col., 2009; Ferreira y col., 2012), siendo empleada para la propagación la técnica de miniestacas, desarrollada por la tesis de maestría en Producción Vegetal de la Ing. Jonicélia Araújo de Souza (2007) la cual viene siendo utilizada en la clonación comercial por empresas forestales brasileras como la BVFORESTAL (Minas Gerais), Florestamento Nobre (São Paulo), entre otras.

Otra especie forestal propagada vegetativamente es el Laurel (*Laurus nobilis* L.), cuya propagación se puede realizar a través de semillas y propagación vegetativa, pero se da exclusivamente a partir de los procesos vegetativos en Brasil, debido que a la planta no produce semillas viables (Herrera y col., 2004).

Otras numerosas especies forestales son propagadas vegetativamente, como es el caso de las del género *Populus* L., *Salix* L., *Criptomera* Thunb. ex L., *Cunninghamia* ,

R.Br. ex A.Rich y más recientemente especies de *Picea* Link, *Pinus*, *Sequoiadendron*, entre otras (Xavier y col., 2013).

Especies forestales nativas brasileras, también son propagadas vegetativamente como el Palo de rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), cuya propagación es factible por semillas y por estacas. Sin embargo, la producción irregular de semillas, la dificultad de acceso a las poblaciones remanentes de una fuerte presión de explotación de los bosques nativos, alta depredación de las semillas por aves, junto con un bajo porcentaje de germinación de las semillas han limitado la producción de plantines a través de las mismas, resaltando la importancia de la propagación vegetativa en esta especie (Handa y col., 2005). Otro caso de propagación vegetativa de especies forestales nativas es el del Cedro misionero (*Cedrela fissilis* Vell.) (Santos y col., 2000; Xavier y col., 2003a).

Las técnicas de propagación a través de estacas (convencionales y miniestacas) pasan por cuatro fases:

1. Producción y colecta de los propágulos (estacas y brotes rejuvenecidos en el caso de la de miniestacas) (una de las etapas más limitantes en el proceso);
2. Preparación de estacas-miniestacas y medio de crecimiento;
3. Enraizamiento (principal limitante de la viabilidad de aplicación de la técnica);
4. Aclimatación de los plantines.

Varias son las técnicas de propagación vegetativa de las especies leñosas. En las especies forestales, se destacan las técnicas de estacas, miniestacas, microestacas, micropropagación y, en casos especiales, las de injertos (inviabilidad del enraizamiento monoclonal y producción de plantas elites del huerto semillero clonal para hibridación).

8.2. Técnicas de Propagación Vegetativa o Clonal

Para que la reproducción a través de estacas ocurra, es necesario que las células del propágulo vegetativo, se desdiferencien, regenerando cada uno de los tejidos de la planta adulta, generalmente iniciando por las raíces. Proceso que se manifiesta de manera diferente según las especies (Xavier, 2002).

Según Alfenas y col. (2004), la formación de raíces es un proceso anatómico y fisiológico complejo asociado con la desdiferenciación y el redireccionamiento del desarrollo de las células vegetales totipotentes para la formación de los meristemas que darán origen a las raíces adventicias. Paiva y Gomes (1995) mencionaron que el proceso de desarrollo de raíces adventicias en estacas y/o miniestacas caulinares se puede dividir en tres fases: en la primera se produce la formación de grupos de células meristemáticas (desdiferenciación); en la segunda ocurre la diferenciación de estos grupos de células en primordios de raíz reconocibles (diferenciación); y en la tercera el desarrollo y la emergencia de la nueva raíz, incluyendo la rotura de otros tejidos del tallo y la formación de conexiones vasculares con los tejidos conductores de la estaca.

Las técnicas de propagación vegetativa (Figura 2) constituyen, actualmente uno de los principales procesos de producción de plantines y son la base de la silvicultura, sobre todo por su efectividad en captar las ganancias genéticas obtenidas de los programas de mejoramiento (Xavier y col., 2013).

La propagación vegetativa (Fig. 2) se clasifica en macropropagación y micropropagación, siendo la macropropagación realizada en cultivo *ex vitro* (*in vivo*) y la micropropagación en cultivo *in vitro*.

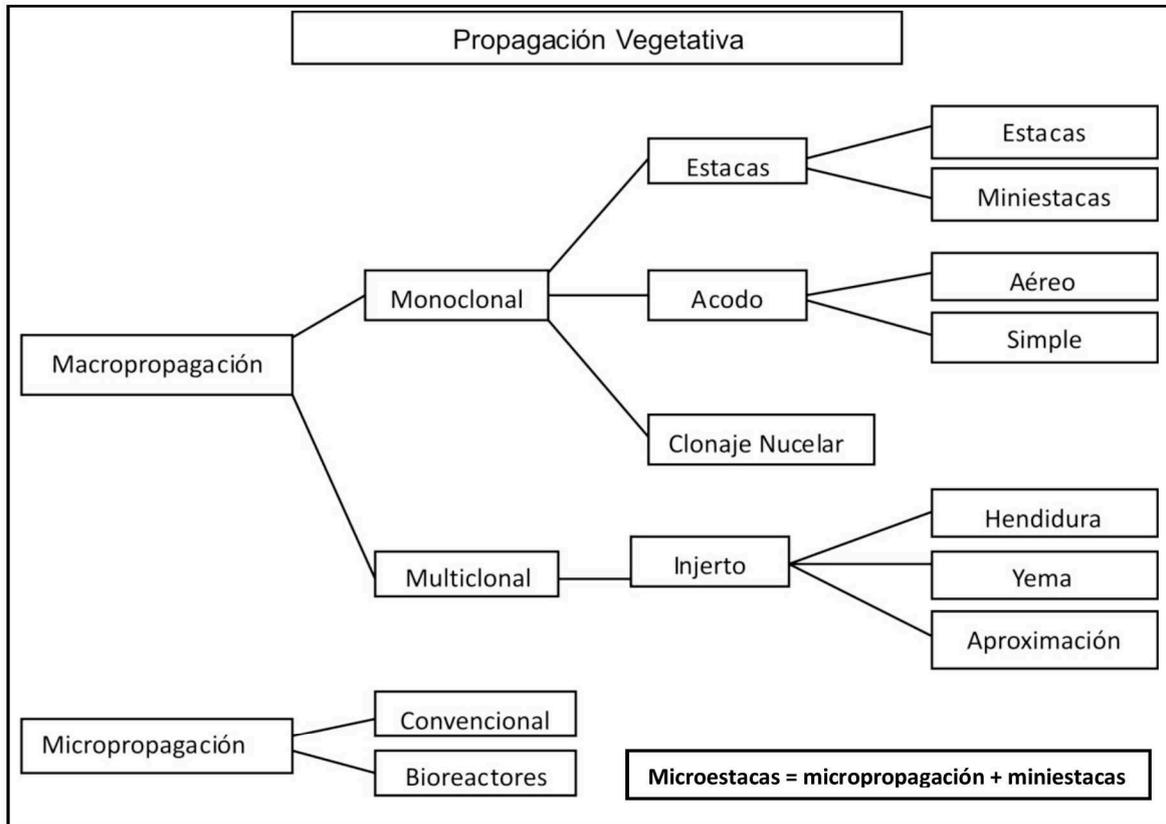


Figura 2. Técnicas de propagación vegetativa de especies leñosas.

8.2.1. Macropropagación

En la macropropagación se utiliza una parte de una planta adulta, de características deseables, como una sección de tallo, brote, estaca o miniestaca (propágulos vegetativos) para multiplicación asexual de la especie (Hartmann y col., 2002). Según estos autores, la macropropagación es el medio más importante para la regeneración clonal de muchos cultivos ornamentales, frutales, nogales y principalmente forestales.

8.2.1.1. Macropropagación Monoclonal y Multiclonal

Con relación al número de individuos (especímenes) empleados, la propagación vegetativa se clasifica en monoclonal o multiclonal. La propagación multiclonal involucra dos o más especímenes para la formación de una nueva planta, como es el caso de la técnica de injertos. En la forestación los injertos solamente son utilizados en casos específicos de especies de difícil enraizamiento, como por ejemplo en la producción de las plantas madres de los huertos semilleros clonales de *Pinus taeda* y para la propagación de materiales selectos de *Prosopis alba* en escala no comercial, así como en *Hevea brasiliensis* L. (Caucho) para conferir al porta injerto resistencia a patógenos (Ewens y Felker, 2003; Xavier y col., 2013; Ewens, Com. Pers.). Los injertos pueden ser de hendidura, yema o por aproximación.

La macropropagación monoclonal involucra la reproducción de un único individuo para la formación de una nueva planta. Comprende las técnicas de estacas, miniestacas, microestacas, acodos y clonaje nucelar.

En las técnicas monoclonales, se puede realizar la inducción del enraizamiento previo o posterior a la separación del propágulo vegetativo de la planta madre. Se

denomina acodo cuando la inducción del enraizamiento es realizado con el propágulo vegetativo en la planta madre, separándolo solamente después del enraizamiento. El acodo puede ser convencional o aéreo.

En tanto que se denomina estaca cuando primeramente se separa de la planta madre el material vegetal, y posterior a eso se realiza la inducción del enraizamiento.

La otra técnica monoclonal es la que se realiza utilizando embriones formados a partir de células de la nucela por apomixis esporofítica o embrionía adventicia. Se trata de embriones generados por mitosis, y la técnica se denomina clonaje nucelar.

8.2.1.2. Macropropagación Monoclonal a Través de la Técnica de Estacas y Miniestacas

El método consiste en forzar el enraizamiento de una rama, brote, hoja o raíz, en un medio adecuado para que se forme una nueva planta completa, con todas las características de la planta madre. En este método la formación de raíces adventicias es un prerequisite para el éxito de la propagación.

La técnica de estacas comprende las estacas convencionales y las miniestacas. En la técnica de estacas convencionales los propágulos vegetativos presentan mayor diámetro, longitud y grado de lignificación que en la de miniestacas. Ésta última es considerada una variación de la técnica de estacas (Xavier y col., 2013).

En la técnica de estacas las plantas madres están a campo conformando un jardín clonal, o estaquero en los casos de las Salicáceas. En la técnica de miniestacas las plantas madres conforman un minijardín clonal y están bajo condiciones controladas de luz, humedad, fertilización, sanidad, etc. y son manejadas con técnicas de rejuvenecimiento (poda en la base de la planta para formación de brotes rejuvenecidos) y comúnmente bajo invernadero.

Con la creciente demanda de plantines de eucalipto y la necesidad de intensificar el proceso de producción, los jardines clonales que eran anteriormente conducidos a campo comenzaron a ser realizados en condiciones controladas, a partir de plantines micropropagados (microjardín clonales) o plantines propagados a través de miniestacas (minijardín clonal), reduciendo el ciclo de producción y mejorando, significativamente, la productividad por unidad de superficie (Higashi y col., 2000).

8.2.2. Micropropagación: Cultivo de Tejidos Clásico y Biorreactores

La técnica de propagación vegetativa a través de la micropropagación tiene la singularidad de que el material vegetativo es cultivado *in vitro*. Es utilizado un pequeño grupo de células, llamado explante, extraído de plantas en el inicio de su desarrollo, o de tejidos meristemáticos de plantas adultas, y el crecimiento de los órganos o tejidos se realiza en un cultivo acéptico en el cual el ambiente, los niveles de nutrientes y las hormonas para el desarrollo de los explantes son altamente controlados (Hartmann y col., 2002).

Esta técnica presenta un mayor rejuvenecimiento, mejor enraizamiento, calidad del sistema radicular y mayor velocidad de emisión de las raíces (Xavier y Comério, 1996). Se caracteriza por una reducción en el tiempo de multiplicación que permite una rápida propagación vegetativa e introducción rápida de nuevos cultivares, y en un reducido espacio, lo que también posibilita la producción de plantines en escala. También, asegura un mayor control de la sanidad del material propagado y principalmente de la conservación de germoplasma, además de facilitar el intercambio internacional de material vegetal (Withers y Engelmann, 1998; Rey, 2004; Scocchi, 2005).

Sin embargo esta metodología requiere la utilización de equipos específicos, personal entrenado en técnicas de cultivo de tejidos y recursos disponibles, limitando en

ciertos casos la aplicación de la misma en bancos de germoplasma (Rey, 2004; Scocchi, 2005).

La micropropagación demostró ser promisorio en la producción de plantines clonales de diferentes especies forestales de difícil enraizamiento. Esta técnica viene siendo utilizada por varias empresas del ramo forestal, pero todavía, no se ha desarrollado tecnología viable para la propagación clonal comercial de numerosas especies forestales de interés.

Pero para determinadas especies forestales se han encontrado numerosos problemas que restringen la micropropagación (Green y col., 1990; Angeloni y col., 1992) como ser altas tasas de contaminación en el establecimiento de los explantes, bajas tasas de multiplicación y serias dificultades en el enraizamiento de los vástagos obtenidos y en el uso de explantes de material adulto.

La micropropagación a través de biorreactores viene siendo frecuentemente usada en los laboratorios de biotecnología para la producción de plantines comerciales. Los biorreactores son equipos para cultivo de células, tejidos u órganos en medio de cultivo líquido (de inmersión continua o temporaria) con monitoreo y control de las condiciones de cultivo. Con relación a la micropropagación convencional este método tiene ventajas como mayores tasas de crecimiento, acelerando el proceso de clonado, menores riesgos de contaminación, menor manipulación del cultivo, necesitando menor mano de obra y resulta más económico que la micropropagación convencional (Teixeira, 2006).

8.2.3. Macropropagación y Micropropagación: Técnica de Microestacas

La técnica de microestacas combina la macropropagación y la micropropagación. En ella las plantas madres pasan por cultivo *in vitro* para lograr mayor rejuvenecimiento del material. O sea en el proceso de propagación clonal por la técnica de microestacas el laboratorio de micropropagación funciona como local de rejuvenecimiento/incremento del vigor de los clones y posterior producción de plantines micropropagados, para suministrar plantas madres al minijardín clonal, en el que a partir de las plantas madres micropropagadas, se realiza la propagación clonal, a través de la técnica de miniestacas (Xavier y Comério, 1996; Xavier y col., 2013). Así, desde el punto de vista operativo, la técnica de microestacas se diferencia de la de miniestacas básicamente por el origen del material que compone el minijardín clonal (Xavier y col., 2013).

Actualmente, la técnica de microestacas es solamente aplicada en clones con problemas de enraizamiento cuando se los multiplica por las técnicas de estacas y miniestacas, dado que la técnica de microestacas ha presentado, para determinados genotipos, ventajas como mayor rejuvenecimiento, mejor enraizamiento, mayor calidad del sistema radicular y de la velocidad en la emisión de raíces. Sin embargo, requiere altas inversiones en laboratorios de micropropagación y establecimiento de protocolos de micropropagación (Xavier y Comério, 1996; Xavier y col., 2013), además del protocolo de miniestacas.

En contrapartida la técnica de miniestacas presenta ventajas tanto en aspectos técnicos, estructurales y operacionales, como en los costos (Wendling y col., 1999) y en determinadas situaciones, resultados tan eficientes como los de las microestacas (Xavier y Wendling, 1998). Así, la miniestaca, ha sido la principal forma de multiplicación de eucaliptos en escala comercial, debido a ventajas en relación a otras técnicas de propagación vegetativa para la mayoría de los genotipos comerciales de esta especie (Higashi y col., 2000; Paula y col., 2003).

9. Factores que Afectan el Enraizamiento

En la propagación vegetativa de especies leñosas el desarrollo de raíces adventicias es un factor clave para el éxito de la propagación (Davies Junior y col., 1982; Hartmann y col., 2002).

Varios factores internos y ambientales influyen en la potencialidad del enraizamiento de estacas y miniestacas. Entre los principales factores se destacan la especie, variedad o clon (genotipo), condiciones fisiológicas y de nutrición mineral de la planta madre (planta donante de material vegetativo - estaca o miniestacas - para la propagación), substrato de enraizamiento, almacenamiento de las estacas o miniestacas, la sanidad y la aplicación de reguladores de crecimiento, así como los factores relacionados con la manipulación de las condiciones ambientales, principalmente la luminosidad, temperatura y humedad (Kramer y Kozlowski, 1972; Westwood, 1982; Hartmann y Kester, 1987; Norberto y col., 2001; Andrejow, 2006; Paes y col., 2006; Almeida y col., 2008; Souza y col., 2009; Xavier y col., 2013).

9.1. Factores Internos

Para cada especie, variedad y/o clon existe un punto óptimo entre tamaño, acumulación de sustancias de reserva y edad de las plantas madres, que debe ser encontrado para poder alcanzar un mejor resultado en cuanto al vigor del rebrote (brotes de la base de la planta usados como propágulos vegetativos) (Brune, 1982), que afectan directamente en el enraizamiento.

Entre los factores internos que influyen en el enraizamiento se destacan la especie, variedad o clon; las condiciones de la planta madre; la edad y localización del

propágulo; hidratos de carbono y nitrógeno; el estado fisiológico y las concentraciones endógenas de hormonas en el propágulo vegetativo.

9.1.1. Especie, Variedad o Clon

Entre los principales factores internos, está el genotipo (especie, variedad o clon), cuyo potencial varía también conforme la época del año, el que está directamente ligado al contenido de carbohidratos. Wendling y col. (2000) encontraron variaciones entre clones de *Eucalyptus* spp. en su estudio de propagación clonal por miniestacas, destacando la importancia del genotipo. Arce y Balboa (1991) observaron que el enraizamiento de *Prosopis chilensis* obtenido de plantas adultas que crecían en el Hemisferio Sur sólo se logró cuando las estacas fueron obtenidas en primavera-verano.

9.1.2. Condiciones de la Planta Madre

La condición de la planta-madre es otro factor que se destaca en el éxito del enraizamiento. Cuanto más joven, vigorosa y sana, mayor será el potencial de enraizamiento de las estacas/miniestacas (Gardner, 1929; Schreiber y Kawase, 1975; Davies Junior y col., 1982; Arce y Balboa, 1991, Paiva y col., 1996; Floriano, 2004).

El estado general y nutricional (principalmente en lo que se refiere a nitrógeno y carbohidratos), además de la constitución genética de la planta madre, tienen una influencia directa, no solo en la producción de estacas, sino también en la emisión de raíces (Hartmann y Kester, 1987; Almeida y col., 2007; Souza, 2007). En plantas madres de *Prosopis alba* De Souza y Felker (1986) comprobaron que la fertilización influyó positivamente en el enraizamiento de estacas de esta especie.

9.1.3. Edad y Localización del Propágulo

La edad y la localización del propágulo vegetativo influyen en el enraizamiento de estacas y miniestacas (Gardner, 1929; Schreiber y Kawase, 1975; Davies y col., 1982; Arce y Balboa, 1991; Paiva y col., 1996; Floriano, 2004).

El tipo de rama o brote, utilizados para realizar las estacas/miniestacas, puede ser un condicionante del enraizamiento, principalmente en especies donde es dificultoso este proceso. De modo general, en algunas especies forestales, hay un gradiente de juvenilidad ontogenética en dirección a la base del árbol, siendo éste variable entre especies (Hackett, 1987), en estos casos, cuando más próximos a la base de la planta estén, mayor es la capacidad de enraizamiento de los propágulos vegetativos.

Con relación a la localización del propágulo (estaca o miniestaca) en la rama o en el brote Borges y col. (2011) observaron que la capacidad de emitir raíces se incrementa de la base al ápice de la rama o brote, y esto está directamente relacionado con el grado de lignificación de los propágulos vegetativos y con los niveles endógenos de hormonas que promueven el enraizamiento.

9.1.4. Hidratos de Carbono y Nitrógeno

El contenido de carbohidratos de los propágulos vegetativos ha sido considerado un factor importante en el éxito del enraizamiento (Lane, 1978; Wendling y col., 2000). Un elevado nivel de reservas con una elevada relación carbono/nitrógeno favorece el enraizamiento (Paiva y Gomes, 1995; Paiva y col., 1996). Según Coruzzi y Zhou (2001) existe una importante interacción entre el contenido de carbohidratos y el contenido endógeno de hormonas, lo que afecta los procesos rizogénicos. Consecuentemente, la

nutrición mineral de las plantas madres puede influenciar en el enraizamiento de estacas y miniestacas (Xavier y col., 2013).

Estacas y/o miniestacas colectadas de una misma matriz y sometidas a los mismos tratamientos responden diferenciadamente en relación a las tasas de enraizamiento, lo que es debido a variaciones en el contenido de reservas (Souza, 2007).

El contenido de carbohidratos puede variar entre especie o clon, cuyo potencial se modifica con la época del año (Wendling y col., 2000).

9.1.5. Estado Fisiológico

En general, estacas herbáceas enraízan mejor que las leñosas (Borges y col., 2011). Las estacas herbáceas tienen mayor capacidad de formar raíces, aunque necesitan de mayor control de las condiciones ambientales durante el enraizamiento (Xavier y col., 2009). Al evaluar el enraizamiento de estacas de tejido adulto (estacas de ramos) y juvenil (estacas provenientes de plantines y de brotaciones de cepas), Fonseca y col. (1991) observaron que el enraizamiento de estacas de jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra* Fr. Allem) ocurrió solamente en estacas de tejido juvenil. En tanto que Paiva y Gomes (1995) consideraron que, para plantas que se propagan fácilmente por estacas, la edad de la planta-madre tiene menor importancia.

Plantas arbóreas sufren cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos al pasar de la fase juvenil a la adulta, que afectan el potencial de clonaje, el vigor de crecimiento y la resistencia a las plagas y enfermedades, que dificultan la propagación vegetativa (Wendling y Xavier, 2001), destacando además que las diferentes partes de la planta presentan diferentes estados de maduración (Alfenas y col., 2004).

Hartmann y Kester (1987) sugieren que la edad del material a multiplicar, principalmente en especies de difícil enraizamiento, puede ser un condicionante del proceso; debido al incremento en la formación de inhibidores del enraizamiento a

medida que la planta crece. Según Abedini (2005), la reducción del potencial de enraizamiento se debería a una disminución del contenido de compuestos fenólicos, los que actuarían como co-factores o sinergistas de las auxinas. Almeida y col. (2007) sugieren que el potencial rizogénico varía con el balance hormonal y la presencia de inhibidores que son afectados por el grado de maduración de los propágulos.

Higashi y col. (2000) sugieren que la edad del material a ser propagado tiene un gran efecto sobre la capacidad de propagación de las plantas y que por ello las técnicas para mantener o inducir la juvenilidad, son claves dentro de cualquier proceso de propagación vegetativa.

El término maduración está estrechamente relacionado a la edad ontogénica de las plantas, haciendo referencia a las distintas etapas del crecimiento de las mismas. Los factores que podrían estar ligados a los mecanismos de maduración estarían determinados por el ambiente, la nutrición y factores propios de la planta. El estrés, principalmente nutricional e hídrico, al afectar la maduración de la planta reduciría la tasa de enraizamiento (Higashi y col., 2000).

En la fase juvenil y adulta las características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas son distintas. De esta forma, una de las características más importantes del envejecimiento de las plantas es la pérdida de su capacidad rizogénica, siendo la madurez de la planta madre un factor limitante del proceso de enraizamiento (Azcón Bieto y Talón, 2000; Higashi y col., 2000; Abedini, 2005; Almeida, 2006). Alcântara y col. (2007) encontraron en ensayos con *Pinus taeda* que la edad de las plantas influye significativamente en la capacidad de enraizamiento; siendo ésta mayor al ser menor la edad de las plantas.

9.1.6. Concentración Endógena de Hormonas Vegetales en el Propágulo Vegetativo

Las hormonas desempeñan un papel fundamental en el enraizamiento adventicio (Hartmann y col., 2002). La formación de raíces en la base de las estacas/miniastacas es una manifestación de crecimiento por morfogénesis (rizogénesis), regulada fundamentalmente por sustancias de tipo hormonal. Por eso la concentración endógena de los reguladores de crecimiento es uno de los principales factores internos que afectan el enraizamiento de estacas/miniastacas, especialmente las auxinas, citocininas y giberelinas. Las auxinas estimulan el enraizamiento adventicio y las citocininas, producidas en las raíces, estimulan la división celular en la parte aérea según la relación auxina/citocinina. Generalmente, alta relación auxina/citocinina favorece la formación de raíces, en tanto que, por el contrario, estimula la formación de los ramos.

Según la concentración, las giberelinas pueden inhibir el enraizamiento de estacas/miniastacas, probablemente por estimular el crecimiento vegetativo, el cual compite con la formación de raíces (Alfenas y col., 2004).

De los reguladores de crecimiento el ácido abscísico (ABA) está entre las sustancias que pueden presentar un efecto inhibitor del enraizamiento; aunque cualquier regulador de crecimiento de las plantas puede causar la inhibición del enraizamiento dependiendo de su concentración (Floriano, 2004). También el etileno en la propagación puede inducir enraizamiento adventicio (Xavier y col., 2013).

La capacidad natural del enraizamiento de algunas plantas se correlaciona con un aumento de factores endógenos promotores y con una disminución progresiva del contenido de inhibidores hacia la primavera (Sivori y col., 1986; Nicoloso y col., 1999; Azcón Bieto y Talón, 2000; Almeida y col., 2007; Bortolini y col., 2008).

Las miniastacas apicales presentan mayores niveles endógenos de hormonas que promueven el enraizamiento, por lo cual, éstas pueden presentar mayor capacidad de enraizamiento (Raven y col., 2007; Borges y col., 2011).

El enraizamiento depende además de la presencia de un cierto número de cofactores que en combinación con las auxinas permiten el enraizamiento. Estos cofactores pueden ser compuestos fenólicos y materiales nitrogenados y azúcares producidos en las hojas y de aquí la importancia de éstas en el enraizamiento (Weaver, 1976; Fochesato y col., 2006; Almeida y col., 2007; Althaus y col., 2007; Bortolini y col., 2008).

Trabajos en miniestacas de *Eucalyptus* spp. y otras especies forestales utilizan la aplicación del IBA para promover el enraizamiento (Titon, 2001; Goulart y col., 2008; Souza y col., 2009; Brondani y col., 2010; Borges y col., 2011). Los clones de *Eucalyptus grandis* W.Hill ex Maiden x *E. urophylla* S.T. Black respondieron más eficientemente a la aplicación de IBA que al ácido naftalenacético (ANA) (Goulart y col., 2008).

9.2. Factores Ambientales

Entre los factores ambientales que afectan el enraizamiento de las estacas están la humedad, la temperatura; la luminosidad, el fotoperiodo (Alfenas y col., 2004), el medio de crecimiento (substrato), en lo que se refiere a la composición, fertilización, ausencia de agentes patogénicos, aeración y pH (Deschamps, 1993), condiciones de asepsia y concentraciones de CO₂ en el ambiente (Floriano, 2004).

El ambiente ideal para enraizamiento de gran parte de las especies forestales, como en el caso del género *Eucalyptus*, es obtenido con sombra parcial, substrato bien drenado, alta humedad relativa, temperatura amena y constante (Brune, 1982). Según Pio y col. (2006), invernáculos con alta humedad relativa y sombreado parcial, propicia el ambiente ideal para el enraizamiento de higuera (*Ficus carica* L.).

9.2.1. Época del Año

La estación del año en que se realiza la propagación también influye en la capacidad de enraizamiento. En los propágulos vegetativos se observan variaciones estacionales en relación con los cambios del cuadro hormonal y nutricional. Ferriani y col. (2006) sugieren que las estaciones del año influyen probablemente por el nivel endógeno de auxinas, carbohidratos y proteínas de las estacas. Duarte y col. (1992) encontraron que la época del año influye significativamente en el porcentaje de estacas enraizadas de *Feijoa sellowiana* Berg. Mientras que Doll y col. (2003) en ensayos con *Buddleja globosa* Hope encontraron que la época del año no influyó en el número final de estacas enraizadas, aunque épocas más cálidas parecen haber acelerado el proceso, teniendo una influencia directa en el porcentaje de sobrevivencia de las mismas.

En el trabajo de Souza y col. (2009) se informó que las miniestacas obtenidas de una misma matriz y sometidas a los mismos tratamientos en diferentes épocas del año responden de manera diferente en relación a la tasa de enraizamiento. Probablemente, cuanto mayor sea el nivel de reservas y la relación carbono/nitrógeno, mayor será la tasa de enraizamiento observado en las miniestacas. Según Nicoloso y col. (1999) estacas cosechadas en un período vegetativo de intenso crecimiento (primavera-verano) poseen pocas reservas de hidratos de carbono y consistencia más herbácea, mientras que las cosechadas en otoño invierno son más lignificadas y con más reservas. Las primeras tendrían además más concentración de auxinas y menos de inhibidores mientras que las de otoño invierno serían menos susceptibles a la desecación. A su vez, la consistencia más herbácea estaría también facilitando el proceso de enraizamiento (Pivetta y col., 2012), lo que puede estar relacionado con la menor lignificación de estos propágulos (Borges y col., 2011).

Por otro lado Zuffellato-Ribas y Domingos Rodrigues (2001) informaron que el mayor porcentaje de enraizamiento en estacas de *Eucalyptus grandis*, fue en invierno, donde obtuvieron un 64% de enraizamiento; mientras que en primavera fue de 42% y en verano de 6%.

Valmorbida y col. (2008) en ensayos con *Trichilia catigua* A. Juss encontraron que la mejor época es la primavera, con 41,67 % de estacas enraizadas. Ferriani y col. (2007) en ensayos con *Mikania micrantha* Kunth encontraron en primavera, verano y otoño los mejores porcentajes de enraizamiento (superiores al 86%).

9.3. Tratamientos para Inducción del Enraizamiento

9.3.1. Tratamientos Mecánicos para Inducción del Enraizamiento

Para la inducción del enraizamiento pueden aplicarse tratamientos mecánicos y/o fisiológicos. Los tratamientos mecánicos, generalmente se relacionan con algún tipo de daño como el descortezamiento, incisión, o retorcimiento en la base de las estacas o miniestacas. Otro tipo de tratamiento mecánico es la impermeabilización de las estacas para evitar resecamiento (Floriano, 2004). Kalil Filho (2000) observó que la impermeabilización, asociada con hormonas, aumentó el enraizamiento de *Hevea brasiliensis*.

9.3.2. Tratamientos Fisiológicos para la Inducción del Enraizamiento

Los principales tratamientos fisiológicos para promover el enraizamiento son el rejuvenecimiento, recuperación del vigor (volver al estado de vigor inicial), el etiolamiento y la aplicación de reguladores de crecimiento.

9.3.2.1. Rejuvenecimiento y Recuperación del Vigor

El rejuvenecimiento consiste en la aplicación de tratamientos o técnicas que buscan alterar el estado fisiológico de la planta pasando del estado maduro al estado juvenil (Wendling y Xavier, 2001).

Para el éxito en la multiplicación vegetativa de plantas adultas, es necesario explotar la mayor capacidad del material juvenil, ya sea mediante la utilización de materiales provenientes de partes juveniles de la planta o por la promoción del rejuvenecimiento de partes adultas (Xavier y col., 2013).

Los métodos para revertir o mantener la juvenilidad de las plantas son la aplicación de ácido giberélico; propagación vegetativa seriada; poda drástica o de yemas apicales; neodiferenciación de yemas; apomixis; inducción de ramos adventicios en porciones de raíces; utilización del crecimiento juvenil originado de los esferoblastos (crecimiento en forma de verruga encontrada en los vástagos); entre otras, siendo que la propagación sexual natural es el método más eficiente en promover el rejuvenecimiento (Hackett, 1987; Xavier y col., 2013).

El rejuvenecimiento para la producción comercial de plantines de especies forestales más utilizado se relaciona con la propagación seriada a través de estacas, miniestacas, microestacas, micropropagación e injertos (Titon y col., 2002; Xavier y col., 2013).

La recuperación del vigor consiste en adoptar prácticas culturales que propician mayor vigor fisiológico a la planta, para que origine propágulos vegetativos con mejor desempeño en la propagación clonal. La adopción del manejo nutricional e hídrico se realiza para mejorar las condiciones fisiológicas de las plantas, así como el uso de la poda drástica (realizado en la técnica de miniestacas y en algunos casos también en la de estacas para materiales de difícil enraizamiento), lo que genera la inducción de brotes dormidos en regiones de mayor juvenilidad ontogénica, constituyendo éste el método más eficiente en el proceso de la propagación clonal (Xavier y col., 2013).

9.3.2.2. Etiolación

La etiolación, causada por la ausencia de luz, se caracteriza por alteraciones fisiológicas, asociadas al decoloramiento y ablandamiento de los tejidos. Está directamente relacionada a la reducción de la lignificación de los tejidos, lo que puede aumentar la capacidad de enraizamiento (Maynard y Bassuk, 1988; Biasi y col., 2002; Floriano, 2004; Borges y col., 2011).

Bassuk y col. (1985), demostraron que la etiolación en plantas madres de *Fagus sylvatica* L., *Carpinus betulus* L. y *Pinus strobus* L. aumentaron significativamente el enraizamiento de estacas de estas especies. En el trabajo de enraizamiento de miniestacas de híbridos de *Eucalyptus globulus* Labill., se observó que la menor lignificación de los tejidos de los propágulos de las miniestacas apicales generada por la etiolación, en relación a las miniestacas intermedias, promovió mejores tasas de enraizamiento, entre otras ventajas (Borges y col., 2011).

Las técnicas de etiolación, posiblemente permitirían la obtención de mejores resultados en la propagación de especies nativas de difícil enraizamiento (Biasi, 1996). Por ello es interesante usar esta técnica de etiolación en los ensayos de enraizamiento de *Prosopis alba* propuestos en esta tesis y evaluar el efecto de la técnica en la capacidad de enraizamiento de estacas y miniestacas, dado que estas últimas presentan menor grado de lignificación, en relación a las estacas.

9.3.2.3. Aplicación de Reguladores de Crecimiento

Entre las hormonas vegetales más conocidas y de interés en la propagación de plantas, se destacan las auxinas, giberelinas, citocininas, etileno y ácido abscísico. En ciertas condiciones las hormonas poseen efecto cuando son aplicadas exógenamente en las plantas, siendo las mismas denominadas reguladores de crecimiento y/o fitorreguladores.

Los reguladores de crecimiento son comúnmente usados en el tratamiento de estacas para aumentar el porcentaje, velocidad, calidad y uniformidad del enraizamiento, con diferentes concentraciones determinadas por la especie, variedad o clon (Wendling y Xavier, 2005).

Las principales aplicaciones de las auxinas en la propagación de plantas son la inducción de raíces adventicias en estacas/miniestacas y el control de la morfogénesis en la micropropagación (Xavier y col., 2013).

Para promover el enraizamiento, en forma comercial las auxinas sintéticas más utilizadas son el IBA y el ANA en forma de polvo fino mezclado con talco inerte o en forma de solución diluida (Cuisance, 1988; Vargas y col., 1999; Azcón Bieto y Talón, 2000; Bortoloni y col., 2008).

La aplicación de auxina en órganos aislados promueve aumento de la respuesta, paralelamente al aumento de la concentración hasta cierto nivel (punto óptimo), dado que posterior a éste comienza a aparecer un efecto inhibitorio (Xavier y col., 2013).

Al evaluar los efectos de auxina y boro en el enraizamiento adventicio de estacas de laurel (*Laurus nobilis*), considerada una especie de difícil enraizamiento adventicio, Herrera y col. (2004) observaron que los tratamientos con auxinas presentaron mayores porcentajes de estacas enraizadas en relación al control y además presentaron mayor uniformidad en la formación de raíces, lo que probablemente, esté relacionado con la acción positiva de la auxina sobre la división celular que da origen a las raíces. Estos biorreguladores conducen a la síntesis de ARN, que interviene en la iniciación del

primordio radicular, favoreciendo la actividad metabólica necesaria para el desarrollo de los tejidos constituyentes de las raíces recién formadas y estimulando su crecimiento.

Titon y col. (2003) obtuvieron los mejores índices de enraizamiento de *Eucalyptus grandis* con 1000 a 2000 mg. L⁻¹ de IBA. Cunha y col. (2004) en ensayos con *Sapium glandulatum* encontraron 52% de estacas enraizadas utilizando 6000 mg L⁻¹, de IBA. Oliva Cruz (2005) encontraron en estacas de *Myrciaria dubia* (Hbk) Mc Vaugh tratadas con IBA mejores resultados que en aquellas no tratadas (testigos).

Sin embargo, con el rejuvenecimiento logrado a través de las técnicas de miniestacas y microestacas el uso de hormonas y reguladores del crecimiento es, en ciertas ocasiones, innecesario. Esto último fue constatado para *Toona ciliata* (Souza y col., 2009), *Eucalyptus grandis* (Wendling y Xavier, 2005), *Myrciaria jabuticaba* (Vell.) Berg (Pereira y col., 2005) y en estacas apicales de *Ficus carica* L. (Pio y col., 2006).

En trabajos con miniestacas de *Eucalyptus* spp. y otras especies forestales se utilizó la aplicación del IBA para promover el enraizamiento (Titon, 2001; Souza y col., 2009; Brondani y col., 2010; Borges y col., 2011). Goulart y col. (2008) observaron que clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* respondieron más eficientemente a la aplicación de IBA que de ANA.

Según Norberto y col. (2001) es necesario un balance entre las sustancias promotoras e inhibidoras del proceso de rizogénesis para que ésta se produzca.

10. Técnica de Miniestacas

La técnica de clonación a través de miniestacas es una técnica promisorio para la producción de plantines clonales de especies forestales. Alfenas y col. (2004) indicaron que la técnica de miniestacas se destaca como alternativa para la clonación en escala comercial de *Eucalyptus* spp.. Esta técnica asociada a programas de mejoramiento es responsable del establecimiento de rodales homogéneos de elevada productividad en un menor tiempo (Souza y col., 2009) y es la más adoptada por las principales empresas forestales de Brasil para la producción comercial de clones de *Eucalyptus* (Martínez-Alonso y col., 2012).

La técnica consiste en la utilización de brotes de plantas propagadas a través de estacas convencionales o por plantines producidos a partir de semillas. Su ejecución se realiza a través de la ruptura de la dominancia apical por la poda de plantas madres (técnica de rejuvenecimiento), las cuáles emiten nuevos brotes que son utilizados para el enraizamiento y la formación de los futuros plantines clonales (Alfenas y col., 2004).

Las plantas madres donantes de brotes para la propagación posterior a la ruptura de la dominancia apical se denominan mini-cepas o mini-setos. El conjunto de plantas madres destinadas a la producción de brotes para la clonación se denomina minijardín clonal.

Esta técnica puede ser considerada una variación de la técnica de estacas, siendo de mayor sensibilidad a las condiciones ambientales al compararse con esta última. Con miniestacas se trabaja con material vegetativo más herbáceo, con manejo intensivo y con un requerimiento mayor de cuidados, en especial, en relación a la colecta y acondicionamiento de las miniestacas (Wendling y col., 2000).

La técnica de miniestacas surgió a partir del perfeccionamiento de la técnica de estacas y micropropagación, evitando las dificultades de ambas técnicas (Alfenas y col., 2004).

La técnica de miniestacas posibilita el suficiente rejuvenecimiento de los materiales vegetales, logrando un aumento considerable de las tasas de crecimiento y de enraizamiento (y en algunos casos reduciendo o hasta eliminando la necesidad de la aplicación de auxinas promotoras de enraizamiento). Además ha posibilitado reducir el tiempo de producción de los plantines; aumentar la productividad por unidad de área, reducir las dimensiones del jardín clonal, disminuir la variación estacional, aumentar el control ambiental, fitopatológico, hídrico y nutricional de las plantas madres, facilitar la cosecha de propágulos vegetativos, disminuir costos de transporte y procesamiento de brotes, aumentar la uniformidad de los plantines clonales, entre otras ventajas (Xavier y Comério, 1996; Xavier y Wendling, 1998; Higashi y col., 2000; Wendling y col., 2000; Titon 2001, Titon y col., 2002; Wendling y Xavier, 2003; Xavier y col., 2003a; Alfenas y col., 2004; Tonello, 2004; Mafia y col., 2005; Santos y col., 2005; Titon y col., 2006; Almeida y col., 2007; Brondani, 2008; Souza y col., 2009; Brondani y col, 2010; Brondani, 2012).

La clonación comercial a nivel de familias, vía material juvenil de origen seminal, es una herramienta potencial para la obtención de mejoras en la calidad del producto fina. Aunque no se tenga la seguridad del genotipo a ser multiplicado, se tiene una estimación de la superioridad de los progenitores, así como una mayor uniformidad de las plantaciones obtenidas y el acortamiento de tiempo en la tala rasa (Souza, 2007).

Para la mayoría de los clones de eucalipto la técnica de miniestacas garantiza un enraizamiento más eficiente de las miniestacas en relación a otras técnicas de propagación vegetativa, conforme lo mencionado por Higashi y col. (2000), debido al proceso de rejuvenecimiento que la planta experimenta hasta la producción de la miniestaca.

La técnica se presenta como una alternativa viable, tanto en las situaciones en que presenta resultados, tan eficiente como los de microestacas, o, muy especialmente, en situaciones en las que la micropropagación es una técnica inviable económica y/o operacionalmente (Tonello, 2004).

La aplicación de miniestacas en la propagación clonal de *Eucalyptus* es una realidad y está bien desarrollada (Xavier, 2002). Santos y col. (2000) destacan la

técnica de miniestacas como una técnica promisoría también para la producción de plantines clonales de especies nativas. Fue observada la viabilidad técnica de la propagación vegetativa por miniestacas en la producción de plantines de varias especies forestales nativas de Brasil y Argentina, como *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze, *Samanea inopinata* (Harms) Ducke, *Swietenia macrophylla* King (Caoba), *Cedrela fissilis* (Santos y col., 2000; Xavier y col., 2003a), entre otras.

Para algunas especies, como para la mayoría de las especies del género *Eucalyptus* cultivados en Brasil, existe suficiente conocimiento científico para la implementación del proceso productivo de plantines a través de la clonación. Sin embargo eso no ocurre para un gran número de especies forestales de interés (Xavier y col., 2003b), como es el caso de *Prosopis alba*.

Las técnicas de propagación a través de estacas (convencionales y miniestacas) pasan por cuatro fases; se inicia con la colecta de los brotes, sigue con la preparación de estacas-miniestacas y medio de crecimiento, posteriormente pasa por el enraizamiento y termina en la aclimatación de los plantines. Siendo la producción de brotes y el enraizamiento las fases más limitantes de este proceso.

11. Aspectos Anatómicos

En los procesos de enraizamiento de estacas es necesario conocer si existen barreras mecánicas que puedan influenciar la capacidad de formar raíces de una estaca de una determinada especie. Muchas especies presentan, lindante con las capas más internas del córtex, una capa completa o discontinua de células de esclerénquima, formando un anillo (Esau, 1977; Mauseth, 1988; Evert, 2006). Según algunos autores, el grado de esclerificación de esta capa está negativamente correlacionado con la capacidad de formar raíces (Beakbane, 1961; Esau, 1977; Davies Junior y Hartmann, 1988; Caro y col., 2002).

Para Metcalfe y Chalk (1957) el anillo de esclerénquima puede ser continuo o aparecer interrumpido y puede estar formado exclusivamente por fibras o por esclereidas. En su máximo desarrollo es contínuo y formado por ambos tipos de células, y ha sido denominado como anillo compuesto contínuo de esclerénquima. Su estructura y continuidad varía en diferentes estadios de desarrollo de una misma especie.

En *Prosopis chilensis*, Caro y col. (2002) determinaron que el enraizamiento logrado se relaciona con discontinuidades en el anillo de esclerénquima ubicado internamente al córtex radical. Beakbane (1961) también menciona que para que se produzca el enraizamiento es necesario una discontinuidad en el anillo de esclerénquima que permita el crecimiento y pasaje a través de dicho anillo del primordio radical en crecimiento.

Sin embargo, en *Camellia sinensis* L. el anillo de esclerénquima por fuera del floema no ha dificultado el desarrollo ni el pasaje del primordio radical adventicio en crecimiento (Koyuncu y Balta, 2004).

Es por esta razón que resulta importante estudiar los aspectos anatómicos del material vegetal a ser utilizado como fuente de propágulo (en esta tesis miniestacas y estacas), previo y posterior al enraizamiento, especialmente en lo que respecta al

desarrollo y estructura del anillo de esclerénquima y la relación del grado de lignificación de las estacas y miniestacas con el enraizamiento de las mismas.

12. Importancia del Trabajo

Lo expuesto anteriormente fundamenta: i) la importancia de evaluar la viabilidad de la propagación vegetativa de *Prosopis alba* a través de la técnica de miniestacas; ii) el efecto del ácido indolbutírico en diferentes concentraciones sobre la capacidad y velocidad de enraizamiento; iii) la influencia de características de las plantas madres y de los propágulos utilizados en el enraizamiento de las miniestacas; y iv) la importancia de comparar la eficiencia de esta técnica con la técnica convencional de estacas. Además, existe la necesidad de estudiar detalladamente los factores que controlan y dificultan el proceso rizogénico, con el objeto de desarrollar un sistema que permita la propagación vegetativa masiva de plantas selectas de algarrobo blanco para la producción forestal de esta especie nativa de gran importancia económica, social y ambiental.

13. Hipótesis

- Es viable la clonación de familias superiores de *Prosopis alba* a través de la técnica de miniestacas.
- La utilización de la técnica de miniestacas presenta mejores y más estables tasas de enraizamiento que la técnica de estacas.
- La aplicación de ácido indolbutírico favorece el desarrollo y crecimiento de los plantines clonales.
- El grado de lignificación y la discontinuidad del anillo de fibras de esclerénquima afectan el enraizamiento de propágulos vegetativos de *P. alba*.
- La época del año influye en el enraizamiento de miniestacas de *P. alba*.

14. Objetivos

14.1. Objetivos Generales:

Los objetivos de esta tesis son: (1) estudiar los factores que influyen en la propagación vegetativa de *Prosopis alba* a través de las técnicas de estacas y miniestacas; y (2) evaluar la viabilidad de la propagación vegetativa de esta especie a través de las técnicas de estacas y miniestacas.

14.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la producción de las plantas madres, del jardín y minijardín clonal.
- Determinar la capacidad de enraizamiento de las estacas y miniestacas en relación con: la necesidad de reguladores de crecimiento, la influencia de diferentes tipos de propágulos y diferentes épocas del año.
- Evaluar el crecimiento de los plantines clonales generados en el proceso de estaqueado y miniestaqueado.
- Analizar las características histológicas y anatómicas de estacas y miniestacas previo y posterior al enraizamiento, relacionando los resultados obtenidos en el enraizamiento con el grado de lignificación de los diferentes propágulos.
- Correlacionar los resultados obtenidos en el uso de miniestacas en relación con los obtenidos en el uso de estacas.

- Evaluar la correlación de los datos de los clones con el material de origen, para determinar los posibles factores de las plantas madres y brotes utilizados que pudieron haber influido en el proceso de rizogénesis.
- Determinar la viabilidad de la propagación vegetativa de *Prosopis alba* en función de los resultados obtenidos en esta investigación.

14.3. Estructura del Trabajo

Por todo ello los resultados de esta tesis se estructuran en 4 capítulos en los que: (1) se compara el Enraizamiento de estacas y Miniestacas de *Prosopis alba* (Capítulo 1); (2) se estudia la influencia de la época del año en enraizamiento de miniestacas de esta especie en estudio (Capítulo 2); y (3) se investigan los aspectos anatómicos relacionados con el enraizamiento de *P. alba* (Capítulo 3); (4) se caracterizan los genotipos clonados de *P. alba* (Capítulo 4). Finalmente se presenta una Discusión general en la que se discuten los resultados de estos tres capítulos en relación con los objetivos y se finaliza con las Conclusiones generales. En el Anexo se presentan los resultados de la caracterización cinética e isoenzimática de peroxidasas en miniestacas y estacas de *P. alba*, observados en la realización de este trabajo.

CAPÍTULO 1

Enraizamiento de Miniestacas de *Prosopis alba*



Enraizamiento de Miniestacas de Prosopis alba

RESUMEN

El algarrobo blanco (*Prosopis alba* Grisebach) es una especie de gran importancia en la composición arbórea de zonas áridas y semiáridas. Posee un gran potencial para la producción de materiales forestales, que son tradicional e intensivamente empleados. Actualmente la especie es propagada comercialmente a través de semillas. Hay un gran interés en obtener tecnologías de propagación, domesticación y mejoramiento de la especie. La propagación vegetativa de especies forestales, asociada a programas de mejoramiento, tiene como finalidad acelerar el crecimiento, aumentar la productividad y uniformidad de los plantíos comerciales. La técnica de clonación a través de miniestacas es una técnica nueva y promisoría para la producción de plantines clonales de especies forestales.

Para algunas especies, como para la mayoría de las especies del género *Eucalyptus* L'Hér cultivados en Brasil, existe conocimiento científico suficiente para la implementación del proceso productivo de plantines a través de la clonación. Sin embargo eso no ocurre para un gran número de especies forestales de interés, como es el caso de *P. alba*.

El principal objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad de la propagación vegetativa a través de la técnica de miniestacas y el efecto del ácido indolbutírico (IBA) en las concentraciones de 0, 3.000, 4.500, 6.000 y 7.500 mg L⁻¹ sobre el enraizamiento de clones de *P. alba*. Las miniestacas presentaron de 98 a 100% de enraizamiento en los tratamientos evaluados. Al aplicar IBA se observó un incremento en el número de hojas y foliólulos de los plantines clonales, como así también, en el peso de materia fresca,

número y longitud de raíces de los plantines clonales, hasta a un punto óptimo entre 3.480 y 4.800 mg L⁻¹.

Paralelamente, se realizó la propagación a través de estacas convencionales con jardín clonal a campo, bajo las mismas condiciones de enraizamiento con el objetivo de comparar la eficiencia de las dos técnicas de propagación. Se observó mayor porcentaje de enraizamiento y supervivencia de miniestacas en relación a las estacas. Se efectuó también un análisis de correlación entre características de las plantas madres (altura, diámetro, número de brotes) y de los propágulos (altura, diámetro) y se observó correlación positiva entre las plantas madres y los propágulos en el enraizamiento como en el tamaño (altura) de los brotes con: la longitud total de raíces; número de foliólulos, y altura de los plantines clonales.

Se propone la técnica de miniestacas como herramienta para la clonación de esta especie.

I. INTRODUCCIÓN

Prosopis alba Grisebach es una especie de gran importancia en la composición arbórea de zonas áridas y semiáridas (Felker y col., 2008), con potencial para la producción de material forestal (Ewens y Felker, 2010). Actualmente este recurso proviene principalmente de áreas naturales, a través de la explotación intensiva de los montes nativos (Patch y Felker, 1997). Debido a esto, hay un gran interés en obtener tecnologías de domesticación, mejoramiento y propagación de esta especie nativa (Verzino y col., 2003; Verga y col., 2005).

En la actualidad, la especie es propagada comercialmente a través de semillas. Numerosos trabajos fueron realizados con el objetivo de lograr una técnica de clonación viable para la comercialización de plantines de clones elites de *P. alba* (De Souza y Nascimento, 1984; Jordan y col., 1985ab; Klass y col., 1985, 1987; De Souza y Felker, 1986; Tabone y col., 1986; Green y col., 1990; Wojtusik y col., 1993; Castillo de Meier y Bovo, 2000; Felker y col., 2005; Felker, 2008; Felker y col., 2008, entre otros mencionados por Arce y Medina, 1997). Sin embargo todavía no existe una técnica de propagación vegetativa monoclonal que sea viable para la producción de grandes cantidades de clones de *P. alba* que serían necesarios para las plantaciones a escala comercial. Debido a las dificultades en el enraizamiento de propágulos Ewens y Felker (2003) y Ewens y col. (2012) recomiendan la utilización del injerto en la propagación de *P. alba*.

Resulta necesario el desarrollo de la silvicultura clonal para la propagación de materiales de interés silvícola (Souza y col., 2009) de alta productividad de biomasa y de vainas, y/o tolerantes a frío/calor, sequía, salinidad y de resistencia a plagas (De Souza y Felker, 1986; Arce y col., 1990; Arce y Medina, 1997; Felker y col., 2005; Felker y col., 2008; Ewens y Felker, 2010).

Alfenas y col. (2004) indicaron que la técnica de miniestacas se destaca como alternativa para la clonación en escala comercial de genotipos de difícil enraizamiento.

Además del los Eucaliptos, esta nueva técnica puede ser empleada por otras especies forestales de interés (Assis, 2001).

La técnica consiste en la utilización de brotes de plantas propagadas a través de estacas convencionales o por plantines producidos a partir de semillas. Su ejecución se realiza a través del quiebre de la dominancia apical por la poda de plantas donantes, las cuáles emiten nuevos brotes que son utilizados para el enraizamiento y formación de los futuros plantines clonales.

Esta técnica puede ser considerada una variación de la técnica de estacas, siendo de mayor sensibilidad a las condiciones ambientales al compararse con esta última. Con miniestacas se trabaja con material vegetativo más herbáceo, con manejo intensivo y con un requerimiento mayor de cuidados, en especial, en relación a la colecta y acondicionamiento de las miniestacas (Wendling y col., 2000).

La técnica de miniestacas ha posibilitado el suficiente rejuvenecimiento de los materiales y ha posibilitado un aumento considerable de las tasas de crecimiento y de enraizamiento, entre otras ventajas en híbridos de *Eucalyptus* (Brondani y col., 2010). Además asociada a programas de mejoramiento es responsable del establecimiento de rodales homogéneos de elevada productividad en un menor tiempo (Souza y col., 2009). Esta técnica es la más adoptada por las principales empresas forestales de Brasil para la producción comercial de clones de *Eucalyptus* (Martínez-Alonso, 2012).

La clonación de familias para producción de plantines en larga escala, en la cual las plantas madres del minijardín clonal son generadas a través de semillas de las mejores familias, está siendo actualmente utilizadas por grandes empresas forestales posibilitando ganancias en tiempo, productividad, calidad y uniformidad de los rodales comerciales (Souza, 2007; Andrejow y Higa, 2009).

Trabajos en miniestacas de *Eucalyptus* spp. y otras especies forestales utilizan la aplicación del ácido indolbutírico (IBA) para promover el enraizamiento (Goulart y col., 2008; Brondani y col, 2010; Borges y col., 2011).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad de la propagación vegetativa de *P. alba* a través de la técnica de miniestacas; el efecto del IBA en diferentes

concentraciones sobre la capacidad y velocidad de enraizamiento; la influencia de características de las plantas madres y de los propágulos utilizados en el enraizamiento de las miniestacas; y comparar la eficiencia de esta técnica con la técnica convencional de estacas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Plantines de *P. alba* fueron producidos a través de semillas provenientes de rodal semillero de la localidad de Vera (Santa Fe, Argentina) - (Latitud 29° 27'55" S y Longitud 60°12'58" O). Estas plantas fueron utilizadas para la formación del jardín y minijardín clonal.

La implantación del minijardín clonal se realizó en cámara de crecimiento con fotoperiodo de 14 h, intensidad de radiación 400 μ E PAR, temperatura día/noche 26/19 °C y humedad relativa del ambiente 60%. Las plantas madres fueron mantenidas en la cámara hasta que tuvieron 2 años. Con dos años (seis meses previo a realización del ensayo de miniestacas) las plantas fueron trasladadas al invernadero del Campo Experimental "Juan Donnet" de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNL) (Latitud 31° 26'31" S y Longitud 60°56'25" O), donde se mantuvieron con temperatura día/noche 26/15 °C y humedad relativa del ambiente 71,5%

Para la formación del minijardín clonal se utilizó la metodología descrita por Souza y col. (2009), con las modificaciones detalladas a continuación. Se utilizaron macetas de 276.5 cm³ con sustrato de compost de residuos sólidos urbanos con 1/4 de arena gruesa (Humedad: 45%; pH: 7,1; N Totales.: 0,9%; P₂O₅: 0,9 %; K₂O: 0,6%) y una densidad inicial de 40 plantas por m². Para promover la formación de brotes rejuvenecidos se cortaron las plantas a 20 cm de la base del tallo y se fertilizaron cada 15 días y un día anterior a la colecta de los brotes con 3 ml por maceta de solución nutritiva Hoagland al ½ (Hoagland y Arnon, 1950). El minijardín clonal estuvo constituido por un total de 55 plantas madres (minicepas), siendo cada una, un genotipo de una familia de medios hermanos.

A la vez se formó, a campo, el jardín clonal, compuesto por 40 plantas madres, con una distribución espacial de 3 x 3 m.

Las matrices fueron identificadas individualmente, como también lo fueron las estacas y miniestacas colectadas de las mismas para el análisis de correlación.

De las plantas madres del jardín clonal se registró previo a la colecta de las estacas: diámetro, altura, región de cosecha de estacas en la planta, año de la rama de la estaca cosechada, región del brote utilizada para preparación de las estacas, número de brotes, diámetro y altura de los brotes.

De las plantas madres del minijardín clonal se registró previo a la colecta de las miniestacas a los dos años y medio de edad: porcentaje de supervivencia, diámetro, altura, número de brotes, diámetro y altura de los brotes (Tabla 1.1).



Figura 1.1.- Plantas madres de *Prosopis alba* en Jardín (A) y Minijardín clonal (B).

Tabla 1.1.- Descripción de los promedios de diámetro a la base del tallo (mm), altura (cm) y número de brotes de las plantas madres y de los promedios de diámetro a la base del tallo (mm) y altura (cm) de los brotes de las plantas madres del Minijardín Clonal y Jardín Clonal en la fecha de la colecta de materiales vegetales para la preparación de las miniestacas y estacas.

| Plantas Madres del Minijardín | | | Brotos del Minijardín | | Plantas Madres del Jardín | | | Brotos del Jardín | |
|-------------------------------|------------|--------------|-----------------------|-----------|---------------------------|-------------|--------------|-------------------|------------|
| DIÁM | ALT | N° de BROTES | DIÁM | ALT | DIÁM | ALT | N° de BROTES | DIÁM | ALT |
| 5,8 ±0,05 | 50,0 ±0,54 | 5,0 ±0,14 | 1,5 ±0,04 | 6,9 ±0,24 | 41,0 ±1,06 | 167,0 ±5,96 | 18,0 ±0,17 | 2,1 ±0,07 | 10,2 ±0,57 |

Medias ± Error Estándar.



Figura 1.2.- Minijardín clonal: Implantación y Manejo.

Se utilizó la técnica de etiolación con el objetivo de mejorar las tasas de enraizamiento a través del aumento de la densidad de plantas madres por m^2 y también a través del sombreado (parcial y total) de los brotes. Ello a los efectos de promover una mayor etiolación en el material del minijardín clonal a ser propagado, la densidad de las plantas madres se aumentó a 256 plantas m^{-2} . A su vez, las plantas madres fueron sometidas a sombreado parcial, y los brotes a partir de los 10 cm de longitud a sombreado parcial de los ápices y a sombreado total en las demás regiones del brote.

Para la preparación de las miniestacas y estacas se empleó la metodología descrita por Souza y col. (2009), con modificaciones. Se realizó en primavera la cosecha de brotes juveniles del jardín clonal y brotes rejuvenecidos (mediante corte de las plantas madres en la base del tallo-recepa) del minijardín clonal para inducción del enraizamiento. Se usó una porción del brote de primavera del mismo año, abarcando yema apical y al menos 3 entrenudos de aproximadamente 6 cm de largo (cuando los brotes tenían más de 6 cm fue descartada la parte basal); y se la conservó con 2 o 3 hojas de las cuales sus foliólulos fueron reducidos al 50% de su área total. A continuación, las miniestacas fueron sometidas a la aplicación de fungicida CHEMCARB® (carbendazim 50%) de la empresa CHEMIPLANT diluido a $1\text{ cm}^3\text{ L}^{-1}$.

Los experimentos fueron dispuestos en un diseño de bloques completos al azar con 4 repeticiones, 5 tratamientos de IBA y 9 plantines clonales por unidad experimental, estando la misma constituida por mezcla de genotipos al azar.

Las miniestacas fueron sometidas a 5 tratamientos con IBA solubilizados en hidróxido de potasio ($\text{KOH } 1\text{ mol L}^{-1}$) aplicados por vía líquida en la base de cada miniestaca y estaca, durante 15 segundos a las concentraciones de: 0, 3.000, 4.500, 6.000 y 7.500 mg L^{-1} y estacas a 3 tratamientos de 0, 3.000 y 6.000 mg L^{-1} .

Posteriormente, se realizó el estaqueado de las estacas y miniestacas en tubetes plásticos de 110 cm^3 de la empresa Dassplastic® conteniendo substrato comercial número 2 de Dynamics® de la empresa Agri Service, fertilizado cada 15 días con 2 ml por tubete de solución nutritiva Bolle Jones (Chaves y col., 2006).

Los tubetes fueron transferidos a cámara de enraizamiento con nebulización intermitente y con humedad superior a 80%, temperatura media máxima de 34,86°C, temperatura media de 23,57, radiación solar 20,48 mJ m⁻² día y heliofanía efectiva promedio de 9,32 h día⁻¹.

Luego de 40 días en cámara de enraizamiento se determinó la supervivencia y el porcentaje de miniestacas y estacas enraizadas. Fueron evaluadas las estacas y miniestacas, y registrados en los plantines clonales originados los siguientes parámetros de vigor: altura, diámetro del tallo, peso de materia fresca de la parte aérea, número de hojas, número de foliólulos y peso de materia fresca, número y longitud total de raíces. Las raíces fueron cuantificadas mediante digitalización de imágenes utilizando el software Image Pro Plus®.

Se utilizó el test de Lilliefors y el de Cochran para determinar la normalidad y homogeneidad de variancias, respectivamente. Posteriormente, los resultados obtenidos se sometieron a análisis de la variancia. Los datos supervivencia y enraizamiento fueron transformados por arco seno $\sqrt{X}/100$, los datos número de hojas, de foliólulos y de raíces fueron transformados por $\sqrt{(X+1)}$ y los datos masa fresca y longitud de raíces fueron transformados por $\log_{10} (X+1)$ de acuerdo a Zimmermann (2004). Las diferencias fueron sometidas a ajustes de regresión y en el caso de ajustes cuadráticos se determinó el punto de inflexión de las curvas por derivación, posibilitando encontrar el punto óptimo de la dosis de IBA. En los resultados se presentan las dosis óptimas para cada variable observada. Se correlacionaron los datos de las plantas madres del jardín clonal y del minijardín clonal con los datos de las estacas y miniestacas de ellos originados, posterior al enraizamiento para determinar los factores de la planta madre y del brote utilizado, que pudieron influir en el enraizamiento a través del coeficiente de correlación de Pearson. Para la realización de los procedimientos estadísticos fueron utilizados los programas estadísticos InfoStat (Di Rienzo y col., 2010) y ASSISTAT Software (Silva y Azevedo, 2009).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se registró 100% de supervivencia de las plantas madres del minijardín y jardín clonal. Los porcentajes de enraizamiento y de supervivencia de las estacas y miniestacas para cada concentración de IBA se muestran en la Tabla 1.2. Se observó mayor porcentaje de enraizamiento y supervivencia de miniestacas en relación a las estacas.

Se destacan las altas tasas de enraizamiento y supervivencia de las miniestacas de *P. alba* (Tabla 1.2) para los 55 genotipos del minijardín clonal que fueron evaluados.

El tratamiento fisiológico de rejuvenecimiento (logrado a través del corte de las plantas madres en el minijardín clonal), sumado al de la etiolación y demás factores que favorecen el enraizamiento, conferidos por la aplicación de la técnica de miniestacas, promovieron el alto porcentaje de enraizamiento logrado. Resultados obtenidos en los trabajos anteriores con estacas en esta especie presentaron tasas de enraizamiento muy variables (Klass y col., 1985, 1987; De Souza y Felker, 1986; Ewens y Felker, 2003; Felker y col., 2005; Felker, 2009; Oberschelp y Marcó, 2010). Ewens y Felker (2003) consideran que la técnica de propagación a través de esquejes (estacas) no es viable para la propagación vegetativa de *P. alba*, a escala comercial.

Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que la juvenilidad del material influyó en el enraizamiento. Xavier y col. (2009) mencionan que los materiales más juveniles tienen mayor capacidad de enraizamiento, a pesar de requerir mayor control de las condiciones ambientales durante el mismo.

Tabla 1.2.- Porcentaje de enraizamiento y supervivencia de estacas y miniestacas de *Prosopis alba* tratados con diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (IBA).

| IBA concentración (mg L ⁻¹) | Enraizamiento (%) | | Supervivencia (%) | |
|--|-------------------|----------------|-------------------|---------------|
| | Estacas | Miniestacas | Estacas | Miniestacas |
| 0 | 4,54 ±0,02 b | 100,00 ±0,02 a | 18,18 ±0,05 b | 94,44 ±0,05 a |
| 3000 | 18,18 ±0,04 b | 100,00 ±0,04 a | 27,72 ±0,05 b | 97,22 ±0,05 a |
| 4500 | - | 100,00 | - | 97,22 |
| 6000 | 0,00 ±0,02 b | 100,00 ±0,02 a | 18,18 ±0,04 b | 97,22 ±0,04 a |
| 7500 | - | 98,00 | - | 94,44 |

Medias ± Error Estándar seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes por el test Tukey ($p < 0,05$).

Otro factor que pudo haber afectado el éxito del enraizamiento fue la etiolación provocada en los explantes, lo que está directamente relacionado con un menor grado de lignificación y con las alteraciones fisiológicas del material vegetativo (Maynard and Bassuk, 1988). Bassuk y col. (1985) demostraron que la práctica de etiolación en plantas madres de *Fagus sylvatica*, *Carpinus betulus* y *Pinus strobus* L. incrementó significativamente el enraizamiento de estacas en las especies mencionadas. Borges y col. (2011), observaron para miniestacas de híbridos de *Eucalyptus globulus* Labill. que la menor lignificación de los tejidos promovió tasas superiores de enraizamiento.

La utilización de IBA influyó el número de hojas y foliólulos (Fig. 1.3), número (Fig. 1.4), peso de materia fresca (Fig. 1.5) y longitud total (Fig. 1.6) de raíces. La aplicación de IBA aumentó el enraizamiento de miniestacas a los 40 días posteriores al estaqueado, y posiblemente, aceleró la formación y el desarrollo del sistema radical. Sin embargo, fue observado un efecto cuadrático en función de la dosis IBA en el comportamiento de estas características. Con el aumento del IBA se observó un aumento de tasas de las variables analizadas hasta un punto óptimo y posterior a este punto el aumento de la dosis de IBA ocasionó una reducción de las mismas. Existen clones de especies forestales que necesitan del estímulo hormonal para potenciar el enraizamiento, como demostraron Brondani y col. (2010); Goulart y col. (2008) y Titon y col. (2003), para clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage x *E. dunnii* Maiden, *E. grandis* W.Hill ex Maiden x *E. urophylla* S.T. Black e *E. grandis*, respectivamente.

Sin embargo, Oberschelp y Marcó (2010) no observaron diferencias significativas en las concentraciones de IBA utilizadas sobre el enraizamiento y altura de plantines de *Prosopis alba* en estacas semileñosas, y sobre altura en estacas herbáceas. La utilización del IBA no influyó en el enraizamiento en híbridos de *E. globulus* (Borges y col., 2011) y en *Toona ciliata* (Souza y col., 2009) Posiblemente ello se debió a los niveles endógenos de auxina del material vegetativo, el que poseía una juvenilidad suficiente para inducir el enraizamiento sin necesidad de aplicación de auxina.

La variación del número de hojas de los plantines a los 40 días, en función de la dosis de IBA, muestra un incremento del número con el aumento de la concentración de IBA hasta un punto óptimo de 4.306,7 mg L⁻¹ (valor obtenido por derivación del punto de inflexión de las curvas generadas por el análisis de regresión de ajustes cuadráticos), observándose una disminución del número de hojas a partir de esta concentración. El número de foliólulos también aumentó con el incremento de la concentración de IBA hasta su punto óptimo 4.113,5 mg L⁻¹, y se presentó un posterior decrecimiento con el aumento de dicha concentración.

Lo mismo fue observado con relación a las variables analizadas del sistema radical. El número, peso de materia fresca y longitud de raíces de los plantines presentaron las mejores respuestas en los siguientes puntos óptimos de las concentraciones 4.840, 3.480 y 3.726 mg L⁻¹, sucesivamente, y a partir de esta dosis comenzaron a presentar un efecto negativo. Comportamiento similar fue observado en clones de Eucalyptus (Goulart y col., 2008). Concentraciones más elevadas de IBA también ejercieron un efecto negativo en el enraizamiento de estacas herbáceas de P. alba (Oberschelp y Marcó, 2010).

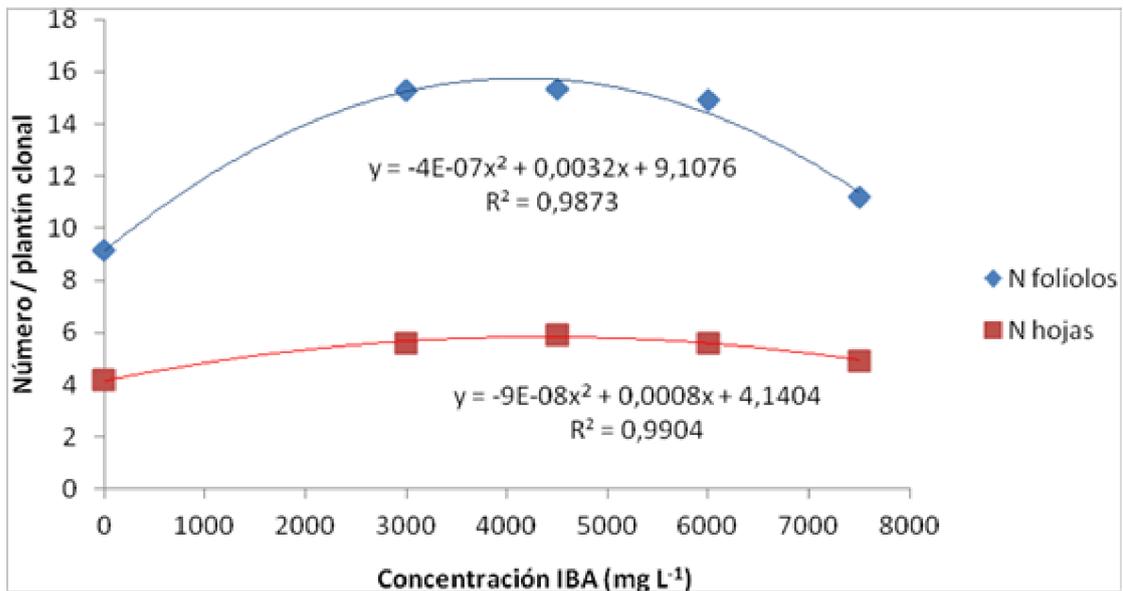


Figura 1.3.- Efecto de la concentración de IBA sobre número de hojas y foliíolos por plantín clonal de P. alba, a los 40 días posteriores a la inducción del enraizamiento, producidos a través de miniestacas.

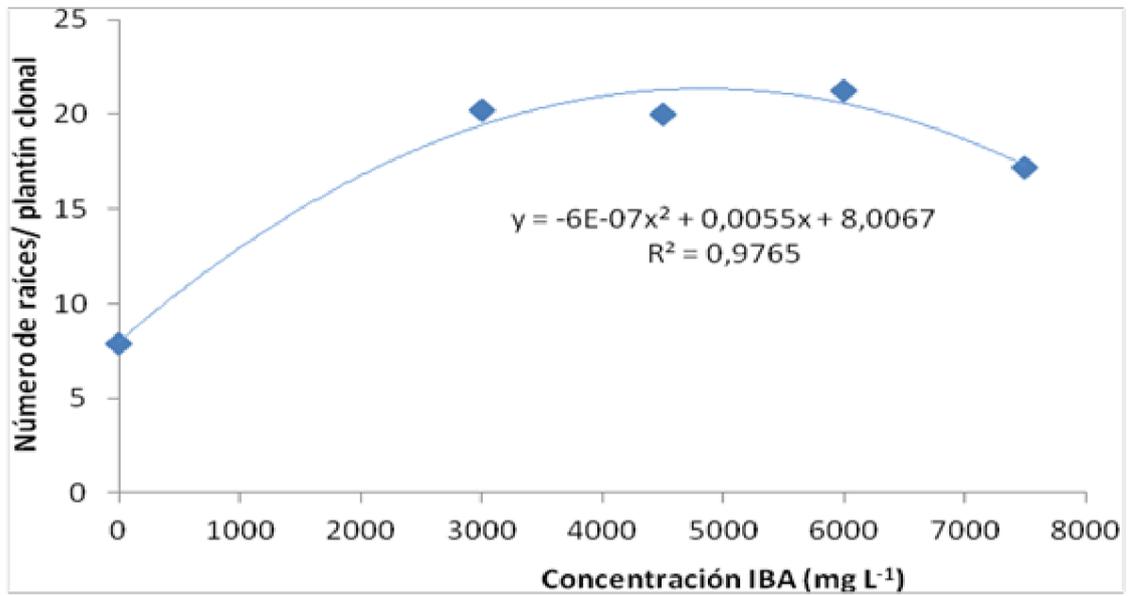


Figura 1.4.- Efecto de la concentración de IBA sobre número de raíces por plantín clonal de P. alba, a los 40 días posteriores a la inducción del enraizamiento, producidos a través de miniestacas.

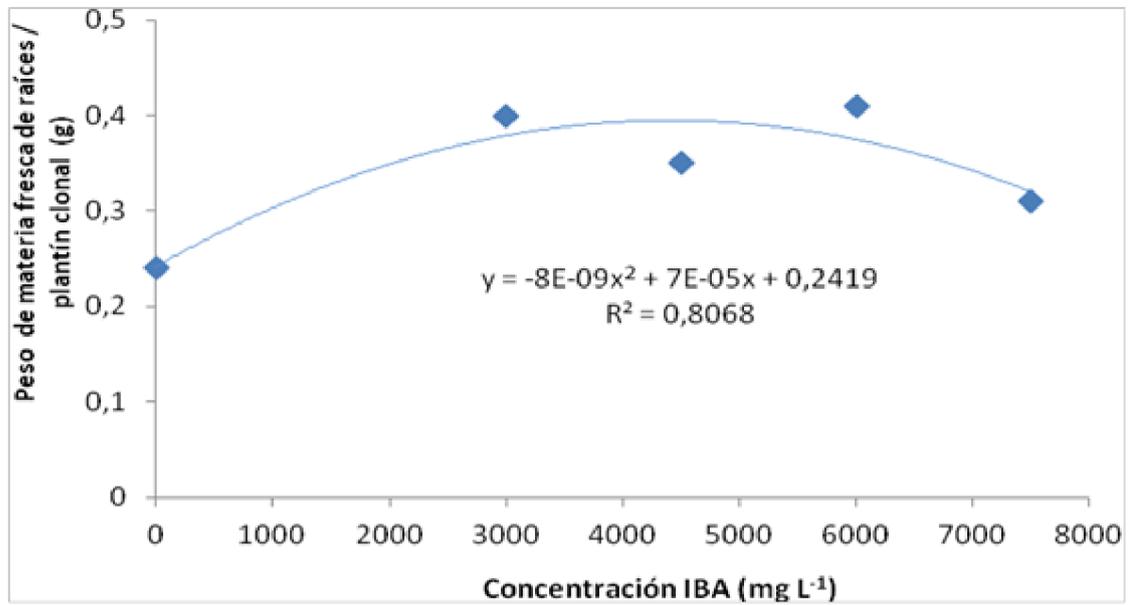


Figura 1.5.- Efecto de la concentración de IBA sobre Peso de materia fresca de raíces por plantín clonal de P. alba, a los 40 días posteriores a la inducción del enraizamiento, producidos a través de miniestacas.

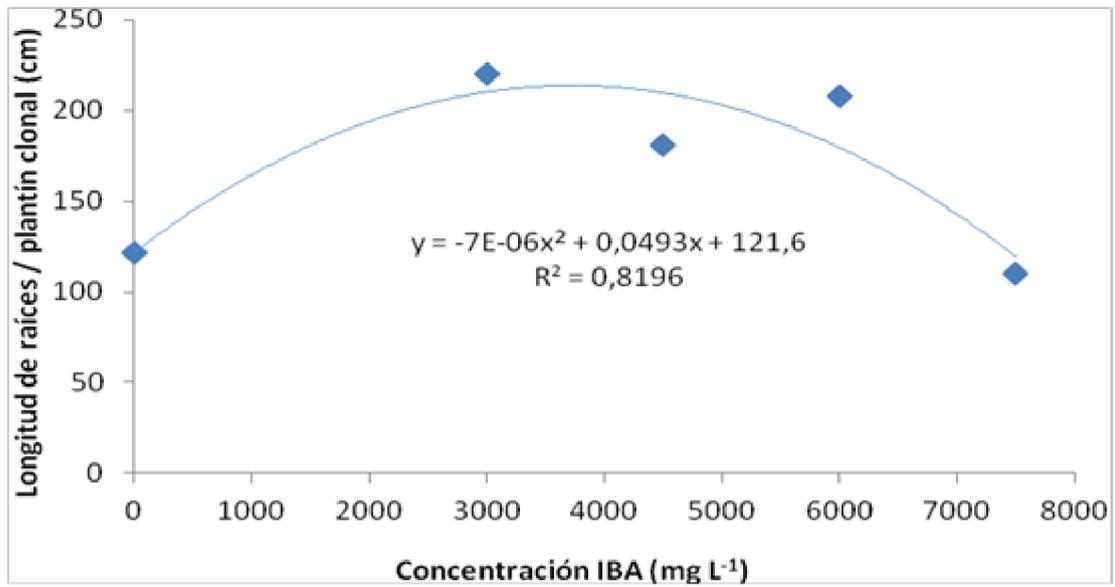
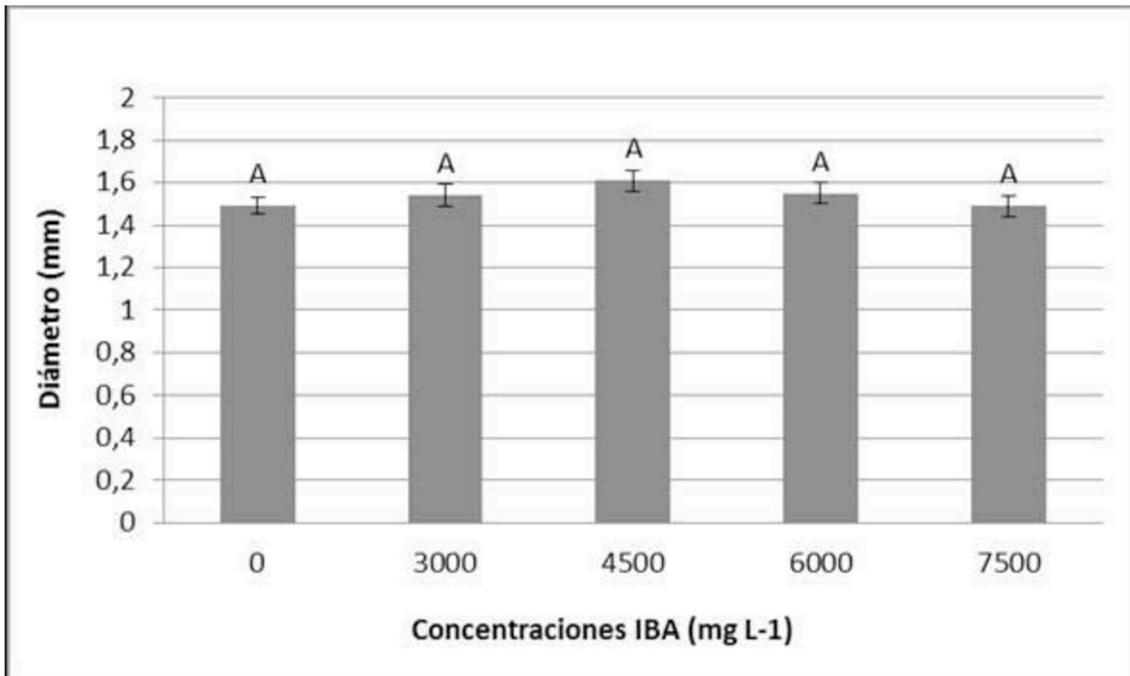


Figura 1.6.- Efecto de la concentración de IBA sobre Longitud total de raíces por plantín clonal de *P. alba*, a los 40 días posteriores a la inducción del enraizamiento, producidos a través de miniestacas.



Letras iguales sobre las medias de los tratamientos indican que no existen diferencias significativas al 5% de probabilidad según el Test de Tukey. Barras representan el Error Estándar de las medias.

Figura 1.7.- Efecto de la concentración de IBA sobre diámetro de los plantines clonales de *P. alba*, a los 40 días posteriores a la inducción del enraizamiento, producidos a través de miniestacas.

Sin embargo la concentración de IBA no influyó en el diámetro de los plantines (Fig. 1.7).

El análisis de correlación demostró relación positiva entre número de foliólulos con materia fresca ($r=0,64$, $p\text{-valor}<0,001$), con número ($r=0,62$, $p\text{-valor}<0,001$) y longitud ($r=0,61$, $p\text{-valor}<0,001$) de raíces. La presencia de hojas en una estaca estimula el enraizamiento, debido a que suministra carbohidratos y hormonas (Xavier y col., 2003b).

Se observaron correlaciones estadísticamente significativas entre los brotes utilizados para preparar las miniestacas y los plantines clonales producidos a partir de éstos, en todas las características evaluadas. Todas las correlaciones fueron positivas y

se destacan las de altura de los brotes con: la longitud total de raíces ($r=0,62$, p -valor $<0,001$), número de foliólulos ($0,56$, p -valor $<0,001$), y altura de los plantines clonales ($0,56$, p -valor $<0,001$).

Estos resultados permiten afirmar que, independientemente de la estandarización del tamaño de las miniestacas, la utilización de los brotes más desarrollados permitió el crecimiento más acelerado de las raíces de los plantines clonales, probablemente en relación a los niveles de reservas de los brotes. Resultado similar fue observado también por Ferreira y col. (2012) y Souza y col. (2009) para *Toona ciliata*, y por Freitas y col. (2010) para *Eucalyptus urophylla*. De acuerdo con Gomes (1987), las reservas son indispensables para la supervivencia del propágulo hasta el enraizamiento y posterior desarrollo, y éstas facilitan la emisión de raíces e incrementan la fotosíntesis. A mayor nivel de reservas y relación Carbono/Nitrógeno, mayor es el enraizamiento de los propágulos y más acelerado resulta el crecimiento de los plantines. Lo anterior concuerda con lo afirmado por Paiva y Gomes (1995).



Figura 1.8.- Plantín clonal de *P. alba*, propagado a través de la técnica de miniestacas, 45 días posteriores a la inducción de enraizamiento. El plantín representa los parámetros de calidad de plantín promedio de los ensayos realizados por la técnica de miniestacas.



Figura 1.9.- Miniestacas de Prosopis alba en Cámara de Enraizamiento.

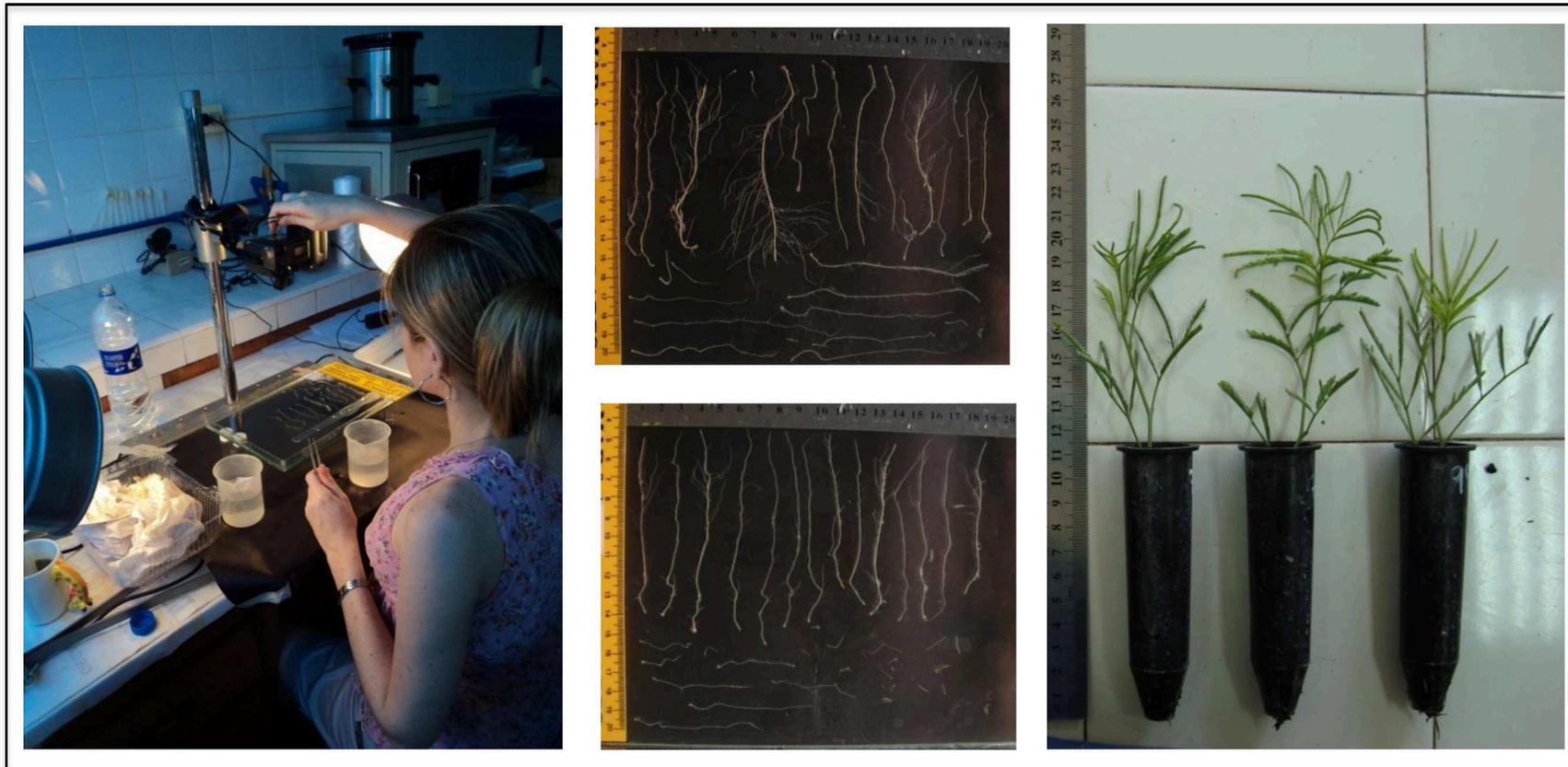


Figura 1.10.- Cuantificación de sistema radical de plantines clonales de *P. alba*, propagados a través de la técnica de miniestacas.

Enraizamiento de Miniestacas de Prosopis alba

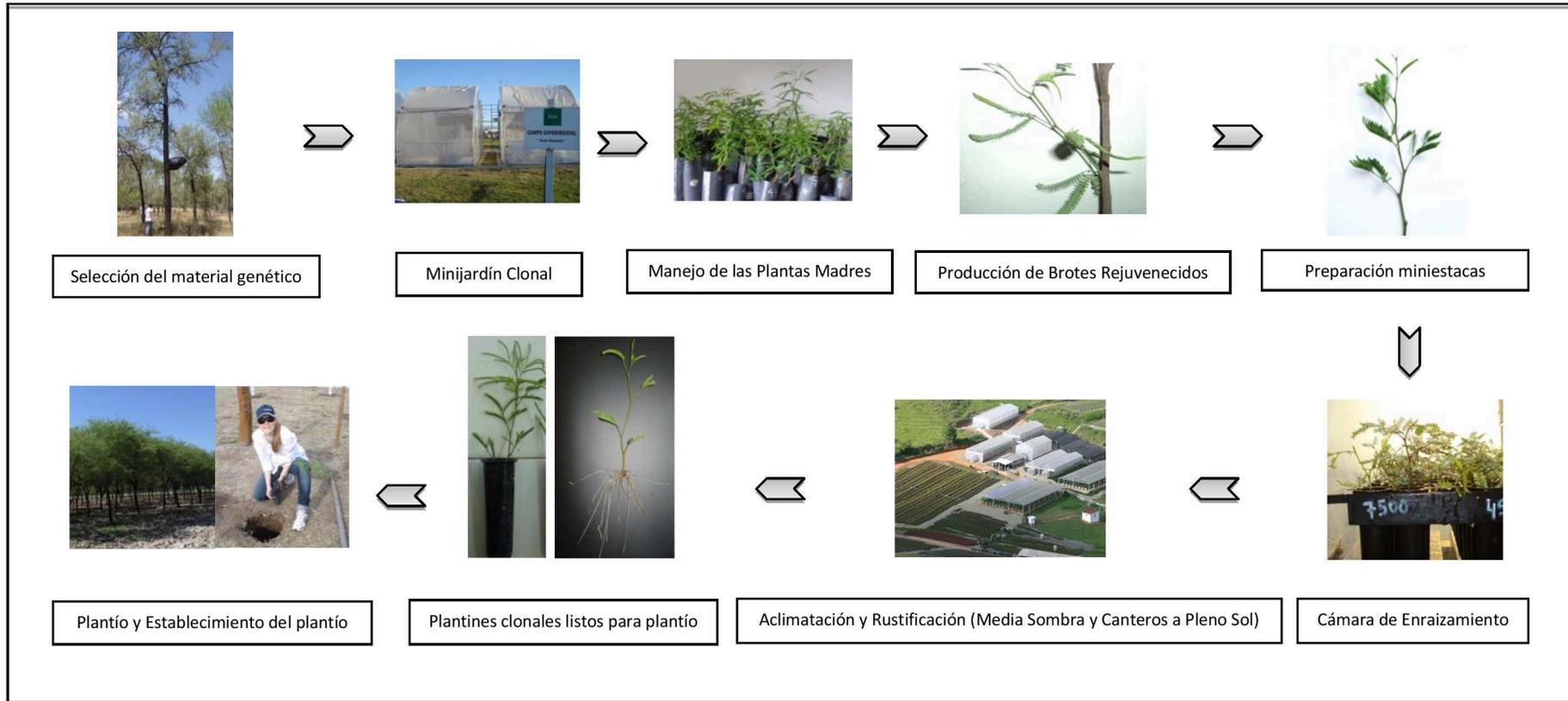


Figura 1.11.- Flujograma de producción de plantines clonales a través de la técnica de miniestacas para la implantación de forestaciones clonales.

IV. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo demuestran que mediante la utilización de la técnica de miniestacas y etiolación puede lograrse la clonación de P. alba con altas y estables tasas de enraizamiento (no variables). Ello nos permite recomendar la técnica para la clonación comercial de familias superiores de la especie.

La aplicación de IBA, entre 3480 y 4800, logró plantines con un sistema radical más vigoroso.

La altura, diámetro y número de brotes de las plantas madres y la altura y diámetro de los brotes mostró una correlación positiva con el enraizamiento de los plantines logrados.

El desarrollo de la silvicultura clonal utilizando la técnica de miniestacas para la producción comercial de plantines clonales de P. alba es una alternativa viable. Sería importante la realización de nuevas investigaciones para validar la técnica de miniestacas en otras especies de interés silvícola.

CAPITULO 2

Influencia de la Época del Año en el Enraizamiento de Miniestacas de *Prosopis alba*



Influencia de la Época del Año en el Enraizamiento de Miniestacas de Prosopis alba

RESUMEN

Durante los últimos años ha aumentado el interés en la forestación de zonas áridas y semi-áridas con especies como las del género *Prosopis*. Varias técnicas de clonación han sido evaluadas con la finalidad de aumentar la productividad, calidad y uniformidad del material para la industria mediante la silvicultura clonal, como así también, de reducir el turno de corte.

El algarrobo blanco posee un gran potencial para la producción de materiales forestales, que son tradicional e intensivamente empleados. Debido a que *P. alba* se propaga por semillas en la actualidad, existe un gran interés en obtener nuevas tecnologías de propagación de la especie. La época del año en que son colectados los propágulos de especies leñosas ejerce, en ciertos casos, influencia sobre el enraizamiento. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la época del año en el enraizamiento de miniestacas de *P. alba*. Las concentraciones de ácido indolbutírico (IBA) utilizadas fueron de 0, 3.000, 4.500, 6.000 y 7.500 mg L⁻¹ diluidos en hidróxido de potasio 1M. Las miniestacas colectadas en primavera al término de 40 días en cámara de enraizamiento presentaron 98 a 100% de enraizamiento en las concentraciones evaluadas. Las miniestacas colectadas en otoño no presentaron enraizamiento en el período evaluado. El presente estudio demostró que la época del año en que son colectadas las miniestacas de *P. alba* afecta el enraizamiento de las mismas.

I. INTRODUCCIÓN

Obtener tecnologías de domesticación, mejoramiento y propagación de Algarrobo blanco es de gran interés (Arce y col., 1990; Arce y Medina, 1997; Verzino y col., 2003; Verga y col., 2005). Su producción comercial de plantines es realizada a través de semillas. Numerosos trabajos fueron realizados con el objetivo de lograr una técnica de clonación viable para la comercialización de plantines de clones elites de *P. alba* (De Souza y Nascimento, 1984; Jordan y col., 1985ab; Klass y col., 1985, 1987; De Souza y Felker, 1986; Tabone y col., 1986; Green y col., 1990; Wojtusik y col., 1993; Castillo de Meier y Bovo, 2000; Felker y col., 2005; Felker, 2008; Felker y col., 2008, entre otros mencionados por Arce y Medina, 1997). Sin embargo la técnica más promisoría ha sido a través de injertos según la metodología descrita por Wojtusik y Felker (1993) y evaluada por Ewens y Felker (2003). Sin embargo, hasta la actualidad aún no ha sido llevada a cabo comercialmente (Ewens, Com. Pers.).

Según Ewens y Felker (2003) a pesar de los avances en el enraizamiento de esquejes (que presentan resultados muy variables), todavía no existe una técnica de propagación vegetativa monoclonal que sea viable para la producción de grandes cantidades de clones de *P. alba*, que serían necesarios para las plantaciones a escala comercial. Debido a las dificultades en el enraizamiento de propágulos citada por Ewens y Felker (2003) los autores Ewens y col. (2012) recomiendan la utilización de injertos en la propagación de *P. alba*.

Para la propagación de materiales de interés silvícola de alta productividad de biomasa y de vainas, y/o tolerantes a frío/calor, sequía, salinidad, y con resistencia a plagas y enfermedades, es indispensable el desarrollo de la silvicultura clonal (De Souza y Felker, 1986; Arce y col., 1990; Arce y Medina, 1997; Alfenas y col., 2004; Felker y col., 2005; Felker y col., 2008; Souza y col., 2009; Ewens y Felker, 2010).

A lo largo de los últimos años se han realizado varios trabajos con el objetivo de desarrollar la clonación de especies forestales nativas utilizando la técnica de miniestacas como método de propagación vegetativa. Estos estudios se concentran en su mayoría en la evaluación en materiales juveniles, en la definición de concentración de reguladores de crecimiento, tipo de sustrato, época del año y evaluación de la

potencialidad de la aplicación de esta técnica (Xavier y col., 2013). Los resultados de estos trabajos, los cuáles han llevado a un desarrollo efectivo de la silvicultura clonal de estas especies, pueden verse comúnmente en la actualidad, aplicados en viveros forestales y en implantaciones forestales de gran escala.

La técnica de miniestacas se destaca como alternativa para la clonación en escala comercial de *Eucalyptus* spp. (Alfenas y col., 2004). El inicio del proceso de clonación de árboles seleccionados de las especies nativas, constituye un gran desafío, sin embargo, la utilización de la técnica de miniestacas como método de propagación clonal ha sido estudiada por varios autores como una nueva técnica, tornándose una alternativa para la producción de plantines clonales de estas especies a escala comercial (Xavier y col., 2013; Souza y col., 2014). Esta técnica puede ser considerada una variación de la técnica de estacas, siendo la de miniestacas de mayor sensibilidad a las condiciones ambientales al compararse con la de estacas. Se trabaja con material vegetativo más herbáceo, con manejo intensivo y con un requerimiento mayor de cuidados, en especial, en relación a la colecta y acondicionamiento de los propágulos (Wendling y col., 2000; Souza y col., 2014).

Esta técnica viene siendo empleada por las principales empresas forestales brasileñas y ha posibilitado el rejuvenecimiento de materiales, y el incremento de las tasas de crecimiento y de enraizamiento en híbridos de *Eucalyptus* (Brondani y col., 2010; Martínez-Alonso y col., 2012). Su implementación en programas de mejoramiento es responsable del establecimiento de rodales homogéneos de elevada productividad en un menor tiempo (Souza y col., 2009).

La técnica de miniestacas consiste en la utilización de brotes de plantas propagadas a través de estacas convencionales o por plantines producidos a partir de semillas. Su ejecución se realiza a través del rescate de la juvenilidad del material por el quiebre de la dominancia apical de las plantas madres por la poda en la base de las plantas (descepa). Posteriormente a la aplicación de esta técnica de rescate de la juvenilidad, las plantas madres emiten nuevos brotes (brotes rejuvenecidos) que son utilizados para la preparación de las miniestacas para el enraizamiento y formación de los futuros plantines clonales, lo que hace que la técnica de miniestacas represente un

método de rejuvenecimiento (Alfenas y col. 2004; Souza, 2007; Baccharin, 2012; Xavier y col., 2013; Souza y col., 2014).

Las grandes empresas del sector forestal de Latinoamérica vienen utilizando la clonación de familias para la producción de plantines a gran escala, en la cual las plantas madres del minijardín clonal son generadas a través de semillas de las mejores familias, permitiendo ganancias en tiempo, productividad, calidad y uniformidad de los rodales comerciales (Souza, 2007; Andrejow y Higa, 2009; Xavier y col., 2013).

Trabajos en miniestacas de *Eucalyptus* spp. y otras especies forestales utilizan la aplicación del ácido indolbutírico (IBA) para promover el enraizamiento (Goulart y col., 2008; Souza y col., 2009; Brondani y col., 2010; Borges y col., 2011; Brondani y col., 2014a, 2014b).

La rizogénesis está influenciada por varios factores, entre ellos, la especie, la época del año, el tipo de propágulos, la juvenilidad de los brotes, la época de colecta, la presencia de yemas y/o hojas, lesiones, balance hormonal, presencia de inhibidores, condiciones nutricionales e hídricas de las plantas madres donantes de propágulos, constituyentes del sustrato y estreses ambientales (Higashi y col., 2000; Ferreira y col., 2004; Souza, 2007; Alfenas y col., 2009; Souza y col., 2009; Xavier y col., 2009; Borges y col., 2011; Hartmann y col., 2011; Souza, 2012; Souza y col., 2013).

La época del año puede ejercer gran influencia en el enraizamiento de estacas/miniestacas, porque las condiciones fisiológicas de las plantas madres son influenciadas por las variaciones estacionales. De esta forma, para cada planta y condición ambiental específica, se debe determinar cuál es la mejor época de cosecha de estacas/miniestacas, así como la influencia de la época en la producción y calidad de los brotes destinados a la propagación. Este es uno de los principales factores para el éxito de la propagación clonal (Hartmann y col., 2011; Xavier y col., 2013).

El contenido de carbohidratos de los propágulos vegetativos ha sido considerado un factor importante en el éxito del enraizamiento (Lane, 1978). Existe una importante interacción entre el contenido de carbohidratos y el contenido endógeno de hormonas,

lo que afecta los procesos rizogénicos. Dichos contenidos se encuentran directamente relacionados con la época del año (Kumar y col., 1999; Coruzzi y Zhou, 2001).

Temperaturas más elevadas muchas veces coinciden con el aumento de la actividad de los brotes, la floración y con mayores tasas de crecimiento y enraizamiento. La época del año influye directamente sobre la temperatura, y consecuentemente en el enraizamiento de especies leñosas (Kibbler y col., 2004). En ensayos con *Pinus taeda* L. fue observado el efecto de la época del año sobre el enraizamiento de miniestacas (Alcantara y col., 2007).

Cunha y col. (2009) también observaron la influencia de las variables climáticas en la producción y enraizamiento de miniestacas de eucalipto.

Arce y Balboa (1991) solamente observaron enraizamiento de *Prosopis chilensis* obtenido de plantas adultas que crecían en el Hemisferio Sur cuando las estacas fueron obtenidas en primavera-verano; siendo éste el periodo de mayor crecimiento vegetativo y actividad reproductiva de la especie. Las características histológicas de los procesos de enraizamiento de estacas es un tema importante en el proceso de propagación vegetativa, pues es necesario conocer si existen barreras mecánicas que pudieran influenciar la capacidad de una estaca de una determinada especie de formar raíces. Muchas especies presentan, lindante con las capas más internas del córtex, una capa de células de esclerénquima (de gruesas paredes celulares lignificadas) que forman un anillo continuo, o discontinuo (Esau, 1977). El grado de esclerificación de dicha capa está negativamente correlacionado con la capacidad de formar raíces (Beakbane, 1961; Esau, 1977; Davies Junior y Hartmann, 1988). Por ello Beakbane (1961) y Caro y col. (2002) sugieren que para que se produzca el enraizamiento es necesario que exista una discontinuidad en el anillo de esclerénquima que permita el crecimiento y pasaje a través del anillo del primordio radical. El grado de lignificación de dicha región varía conforme a la época del año (Lima y col., 2011).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la época del año y del IBA en la propagación vegetativa de *P. alba* a través de la técnica de miniestacas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Implantación y Manejo del Minijardín Clonal

El minijardín clonal fue establecido en cámara de crecimiento con fotoperíodo de 14 h, intensidad de radiación 400 μE PAR, temperatura día/noche 26/19 °C y humedad relativa del ambiente 60%. Las plantas madres de *P. alba* del minijardín clonal fueron producidas a través de semillas provenientes de rodal semillero de la localidad de Vera, Provincia de Santa Fe, Argentina (Latitud 29° 27'55'' S y Longitud 60°12'58'' O). El minijardín estuvo constituido por un total de 55 plantas madres (minicepas), siendo cada una, un genotipo de una familia de medios hermanos.

Posterior al establecimiento del minijardín clonal las plantas madres utilizadas en esta investigación fueron trasladadas a invernadero con temperatura día/noche 26/15 °C y humedad relativa del ambiente 71,5% ubicados en el área experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNL), hemisferio sur (Latitud 31° 26'31'' S y Longitud 60°56'25'' O).

Fue utilizada, para la formación del minijardín clonal, la metodología descrita por Souza y col. (2009), con las modificaciones detalladas a continuación. Se emplearon macetas de 276 cm³ con sustrato de compost de residuos sólidos urbanos y de arena gruesa en proporción 3:1 (Humedad: 45%; pH: 7,1; N Total.: 0,9%; P₂O₅: 0,9 %; K₂O: 0,6%) y una densidad inicial de 40 plantas por m².

Cuando todas las plantas madres alcanzaron 15 cm de altura, se efectuó el corte de las mismas en la base del tallo (descepa) para promover el rejuvenecimiento de los brotes originados en la base de las minicepas. Estos brotes rejuvenecidos fueron utilizados para el preparado de las miniestacas.

Luego de la descepa, las plantas madres fueron fertilizadas con 3 ml de solución nutritiva Hoagland al 50% (Hoagland y Arnon, 1950) por maceta cada 15 días y un día previo a la colecta de los brotes para el preparado de las miniestacas.

Con la finalidad de promover la etiolación del material del minijardín clonal a ser propagado se aumentó la densidad de plantas a 256 plantas m⁻² y las mismas fueron parcialmente sombreadas. Además, se expusieron los brotes de 10 cm de longitud a un sombreado total, con excepción de los ápices de los mismos.

En los ensayos conducidos en primavera las plantas madres poseían la edad de 30 meses, mientras que en las experiencias de otoño estas tenían 38 meses de edad.

Enraizamiento de Miniestacas

Se realizó la cosecha de brotes rejuvenecidos del minijardín clonal para la inducción del enraizamiento de primavera en la primera semana del mes de octubre y los de otoño en la segunda quincena del mes de mayo.

Para la preparación de las miniestacas se empleó la metodología descrita por Souza y col. (2009), con modificaciones. Fue utilizada una porción del brote abarcando la yema apical y al menos 3 entrenudos de aproximadamente 6 cm de largo, conservando 2 o 3 hojas con sus foliólulos reducidos al 50% de su área total. En caso de brotes que poseían más de 6 cm de longitud se le descartó la parte basal. A continuación, las miniestacas fueron sometidas a la aplicación del fungicida CHEMCARB® (carbendazim 50%) de la empresa CHEMIPLANT diluido a 1 cm³ L⁻¹.

Ambos experimentos (primavera y otoño) fueron dispuestos en un diseño en bloques completos al azar con 4 repeticiones, 5 tratamientos de IBA y 9 plantines clonales por unidad experimental, estando la misma constituida por mezcla de genotipos al azar.

Las miniestacas fueron sometidas a 5 tratamientos de IBA solubilizados en hidróxido de potasio (KOH 1 mol L⁻¹) y aplicados por vía líquida en la base de cada miniestaca durante 15 segundos a las concentraciones de: 0, 3.000, 4.500, 6.000 y 7.500 mg L⁻¹.

Posteriormente, se procedió al estaqueado de las miniestacas en tubetes plásticos de 110 cm³ de la empresa Dassplastic® conteniendo substrato comercial número 2 de

Dynamics® (Agri Service). Las miniestacas fueron fertilizadas cada 15 días con 2 ml de solución nutritiva Bolle Jones (Chaves y col., 2006) hasta la finalización de las experiencias.

Luego del estaqueado las miniestacas fueron trasladadas a la cámara de enraizamiento con nebulización intermitente y humedad superior a 80%. Las condiciones del ambiente en las experiencias de primavera y otoño se detallan en la Tabla 2.1.

La evaluación de la sobrevivencia y porcentaje de miniestacas enraizadas se efectuó a los 40 días posteriores a la inducción del enraizamiento. De cada miniestaca enraizada se registraron los siguientes parámetros de calidad de plantín: altura, diámetro del tallo, peso de materia fresca de la parte aérea, número de hojas y de foliólulos, peso de materia fresca, número y longitud total de raíces. Las raíces fueron cuantificadas mediante digitalización de imágenes utilizando el software Image Pro Plus®.

El análisis estadístico fue efectuado con el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo y col., 2010) aplicándose ANOVA y comparaciones de medias según el test de Tukey al 5% de probabilidad.

Tabla 2.1.- Promedios de los datos meteorológicos registrados en los ensayos de enraizamiento de *Prosopis alba* en las distintas épocas del año (primavera y otoño).

| Época del año | Temp. Media Máxima (°C) | Temp. Media (°C) | Radiación Solar (mJm ⁻²) | Heliofanía Efectiva (h día ⁻¹) |
|---------------|----------------------------|---------------------|---|---|
| Primavera | 34,86 | 23,57 | 20,48 | 9,32 |
| Otoño | 21,09 | 14,04 | 9,98 | 7,2 |

Aspectos Anatómicos

Fueron colectadas muestras de miniestacas en primavera y en otoño previo a la inducción del enraizamiento y 40 días después de acondicionadas en cámara de enraizamiento con el objetivo de analizar los aspectos anatómicos relacionados al grado de lignificación de las miniestacas utilizadas en este experimento en las distintas épocas testeadas. Se colectaron muestras de 0,5 cm de la porción basal de miniestacas. Estas fueron fijadas en FAA (formol: ácido acético: etanol 70%, 10: 5: 85, v/v/v). Posteriormente fueron deshidratadas en una serie creciente de graduaciones de alcohol etílico, clarificadas con xilol e incluidas en parafina (Johansen, 1940; Ruzin, 1999). Luego, mediante un micrótopo rotativo se realizaron cortes transversales seriados de 12-15 μm de espesor, los que fueron coloreados con safranina-fast green y montados en bálsamo de Canadá (D'Ambrogio de Argüeso, 1986).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se registró 100% de supervivencia de las plantas madres del minijardín en primavera y en otoño. La supervivencia de las miniestacas para cada época del año y concentración de IBA se detalla en la Figura 2.1. Se observó un mayor porcentaje de miniestacas vivas en primavera en relación a las propagadas en otoño.

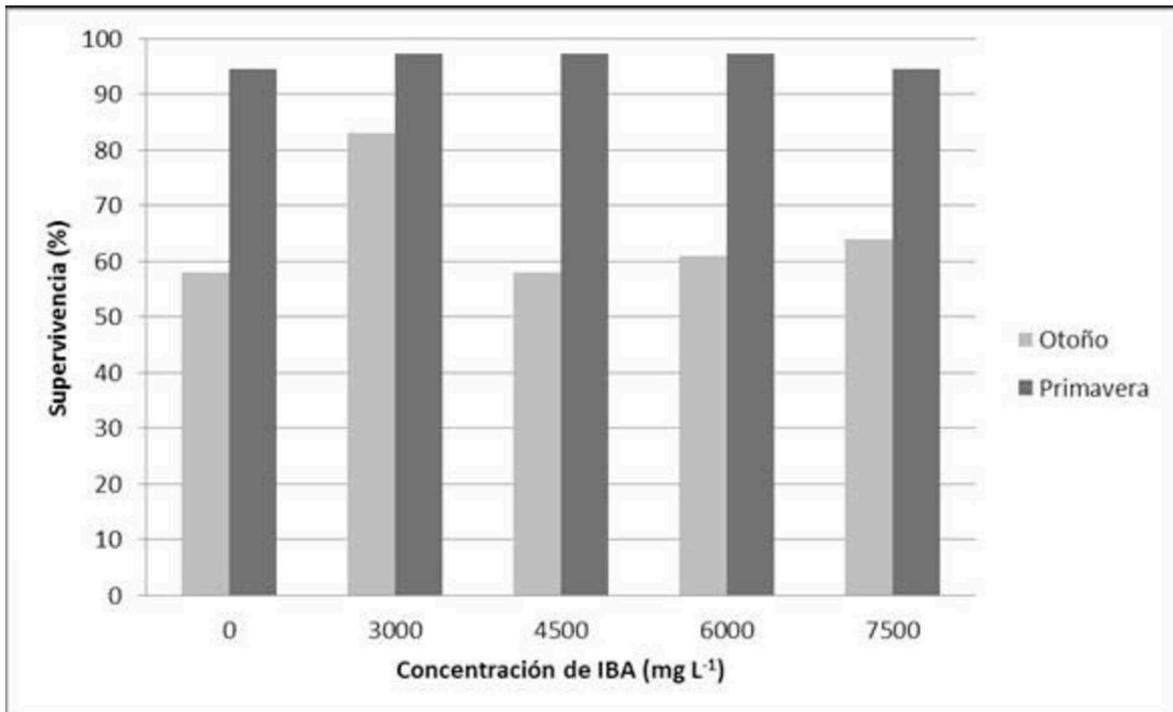


Figura 2.1.- Efecto de la época del año (otoño y primavera) sobre la supervivencia de miniestacas de *P. alba*, a 40 días posterior a la inducción del enraizamiento, con diferentes concentraciones de IBA.

En otoño no fue observado enraizamiento de miniestacas. Por el contrario, en primavera se observaron altas tasas de enraizamiento y supervivencia de miniestacas en todas las concentraciones de IBA evaluadas (Tabla 2.2).

Arce y Balboa (1991) estudiando la estacionalidad en el enraizamiento de *P. chilensis* en Chile, observaron que solamente fue posible inducir el enraizamiento en estacas colectadas a campo durante el período correspondiente al mayor crecimiento vegetativo y actividad reproductiva de la planta y que no se produjo el enraizamiento en las estacas colectadas en el período de reposo de las plantas madres, lo que coincide, con los resultados observados en este trabajo.

Tabla 2.2.- Porcentaje de enraizamiento de miniestacas de *Prosopis alba* a los 40 días posteriores a la inducción del enraizamiento, en diferentes épocas y tratadas con diferentes concentraciones de IBA.

| IBA concentración (mg L ⁻¹) | Época del año | |
|---|---------------|-----------|
| | Otoño | Primavera |
| 0 | 0 | 100 |
| 3000 | 0 | 100 |
| 4500 | 0 | 100 |
| 6000 | 0 | 100 |
| 7500 | 0 | 98 |

Souza y col. (2009) observaron que miniestacas de cedro australiano colectadas de una misma planta madre y sometidas a los mismos tratamientos, responden de manera distinta en relación a su enraizamiento en las diferentes épocas del año. De acuerdo con Wendling y col. (2000) el contenido de carbohidratos está entre los factores internos que influyen en el enraizamiento y su potencial varía según la época del año, especie o clon.

Especies forestales de regiones áridas y semi-áridas tales como las especies de *Prosopis* spp. requieren de alta temperatura (35°C aproximadamente) e intensidad luminosa (>200 mol m⁻² s⁻¹) para que se produzca inducción del enraizamiento de

estacas (Klass y col., 1985; Felker, 2008). Las observaciones de estos autores están de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestra investigación.

En primavera, donde se ha observado una alta tasa de enraizamiento, la temperatura y la intensidad luminosa alcanzaron los valores requeridos por la especie para que ocurra la inducción del enraizamiento según Klass y col. (1985) y Felker (2008). Posiblemente, en otoño la temperatura e intensidad luminosa no alcanzaron los requerimientos anteriormente mencionados y consecuentemente, no se observó enraizamiento de las miniestacas.

La temperatura puede influenciar el enraizamiento a través de su acción en la absorción de nutrientes y en el metabolismo, especialmente en regiones de clima subtropical. Entonces, este factor ambiental debe ser ajustado para una óptima producción de miniestacas (Corrêa y Fett-Neto, 2004). La división celular es favorecida con el aumento de la temperatura, promoviendo la formación de raíces y la producción de brotes (Hartmann y col., 1997). Posiblemente este factor ha ejercido influencia en el logro de altas tasas de enraizamiento de *P. alba* en primavera. Sin embargo, temperaturas excesivamente altas durante la fase de enraizamiento deben ser evitadas, porque estimulan el desarrollo de yemas laterales previo a la formación de raíces. Temperaturas muy elevadas pueden generar aumento en la transpiración y pérdida de agua por las hojas (Hartmann y col., 1997; Xavier, 2002). Contrariamente, las bajas temperaturas disminuyen el metabolismo de estacas/miniestacas, determinando un mayor tiempo para el enraizamiento. Bajas temperaturas pueden impedir que se establezcan las condiciones adecuadas para la inducción, desarrollo y crecimiento radical, influyendo negativamente en el proceso de rizogénesis (Xavier, 2002; Cunha y col., 2009; Souza y col., 2013; Xavier y col., 2013). Lo anteriormente expuesto pudo haber sido uno de los factores por el cual no se observaron miniestacas enraizadas de *P. alba* en otoño.

Hansen (1989) observó que la temperatura de 17 °C durante nueve semanas continuas inhibió la emisión de raíces en *Stephanotis floribunda*. Sin embargo, al mantener las mismas plantas a 23°C el porcentaje de enraizamiento de estacas fue superior a 92%. Se destaca entonces, la necesidad de llevar a cabo investigaciones con

el objeto de evaluar la temperatura adecuada para el enraizamiento de cada material vegetativo.

La intensidad lumínica es otro factor que influye en el enraizamiento y está directamente relacionado a la época del año. Este factor puede afectar la concentración endógena de citoquininas que poseen funciones inhibitoras del enraizamiento (Assis y col., 2004; Cunha y col., 2009). Klass y col. (1985) encontraron que las altas intensidades de luz fueron absolutamente críticas para el enraizamiento de estacas de *P. alba* (9% de enraizamiento a $150 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y 69% de enraizamiento a $520 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Cunha y col. (2009) observaron que el enraizamiento de miniestacas de clones de Eucaliptos y su producción por plantas madres, fueron beneficiadas con el aumento de la intensidad lumínica en el minijardin clonal. Fett-Neto y col. (2001) también observaron influencia de la luz sobre la rizogénesis adventicia de *E. saligna* y *E. globulus*. La intensidad lumínica óptima es extremadamente difícil de especificar y depende del genotipo y ambiente de las plantas madres y esto afecta el enraizamiento (Wilson, 1998).

En la clonación de miniestacas de *Pinus taeda*, Alcantara y col. (2007), observaron mayor desarrollo de raíces en primavera debido a que las plantas madres tuvieron un período de mayor actividad metabólica y de acumulación de sustancias de reservas. Estos autores también observaron en otoño bajos porcentajes de enraizamiento en las miniestacas, cuyas plantas madres poseían hasta 90 días. Cuando las miniestacas fueron originadas de plantas madres de más de 90 días no se observó enraizamiento de las mismas. Lo observado en el trabajo de Alcantara y col. (2007) en miniestacas de *P. taeda* es comparable a los resultados obtenidos en nuestra investigación con miniestacas de *Prosopis alba*.

El bajo porcentaje de enraizamiento registrado en otoño en relación al observado en primavera, también concuerda con los resultados publicados por Foster y col. (2000) en estacas de *P. taeda*. Además, en estacas de *E. globulus* Wilson (1998) observó que en otoño las mismas presentaron menor capacidad de enraizamiento. Alcantara y col. (2007) indicaron que el bajo porcentaje de enraizamiento en otoño es causado por la

reducción de la actividad metabólica de las plantas madres donantes de propágulos en esta época del año, lo que reduce la formación de raíces adventicias.

Souza y col. (2013) al evaluar la influencia de diferentes patrones de miniestacas y la estacionalidad en el enraizamiento y producción de plantines del híbrido de *E. grandis* Hill x *E. urophylla* S.T. Black observaron diferencias en el crecimiento de los plantines clonales según la época del año.

Con relación a la altura de las miniestacas evaluadas en primavera y otoño (Tabla 2.3), se observaron diferencias significativas solamente en las miniestacas que no fueron tratadas con IBA. Esta respuesta posiblemente fue debida al mayor contenido de reservas en los brotes cosechados en otoño. Las miniestacas tratadas con IBA no presentaron diferencias significativas en altura, probablemente por la relación contenido de reservas: concentraciones de IBA (Kumar y col., 1999; Coruzzi y Zhou, 2001).

Con relación al diámetro de las miniestacas evaluadas en primavera y otoño, las miniestacas tratadas con 6.000 mgL^{-1} presentaron diferencias significativas, siendo mayor el diámetro en las miniestacas de primavera. Esta última concentración generó mayores tasas de enraizamiento y crecimiento en primavera (Tabla 2.3).

Tabla 2.3.- Influencia de la época del año sobre la altura y diámetro de miniestacas de *Prosopis alba* a los 40 días posteriores a la inducción al enraizamiento, tratadas con diferentes concentraciones de IBA.

| Concentración IBA (mg L ⁻¹) | ALT MINIESTACAS | | DIÁM MINIESTACAS | |
|--|-----------------|--------------|------------------|--------------|
| | OTOÑO | PRIMAVERA | OTOÑO | PRIMAVERA |
| 0 | 5,98 ± 0,21a | 3,82 ± 0,06b | 1,56 ± 0,19a | 1,49 ± 0,04a |
| 3.000 | 4,70 ± 0,19a | 4,47 ± 0,05a | 1,64 ± 0,32a | 1,54 ± 0,05a |
| 4.500 | 5,25 ± 0,32a | 4,56 ± 0,06a | 1,71 ± 0,31a | 1,6 ± 0,05a |
| 6.000 | 5,39 ± 0,14a | 5,33 ± 0,04a | 1,34 ± 0,32b | 1,54 ± 0,05a |
| 7.500 | 5,35 ± 0,23a | 5,20 ± 0,06a | 1,37 ± 0,35a | 1,48 ± 0,05a |

Letras iguales sobre las medias de los tratamientos indican que no existen diferencias significativas al 5% de probabilidad según el Test de Tukey. ± Error Estándar de las medias.

El tratamiento fisiológico de rejuvenecimiento (corte de las plantas madres en el minijardín clonal) sumado al de etiolación (mayor densidad de plantas madres por m² y sombreado parcial de las plantas madres y total de los brotes) concedidos por la técnica de miniestacas en *P. alba* promovieron el alto porcentaje de enraizamiento logrado en primavera. Investigaciones previas con estacas en esta especie presentaron tasas de enraizamiento muy variables (Klass y col., 1985, 1987; De Souza y Felker, 1986; Ewens y Felker, 2003; Felker y col., 2005; Felker, 2009; Oberschelp y Marcó, 2010). Ewens y Felker (2003) consideraron que la técnica de propagación a través de estacas no es viable para la propagación vegetativa de *P. alba* a escala comercial.

Xavier y col. (2009) mencionaron que los materiales más juveniles tienen mayor capacidad de enraizamiento. Ésto pudo haber influido en el mejor enraizamiento de primavera observado en nuestra investigación.

Otro factor que pudo haber favorecido el enraizamiento fue el menor grado de lignificación de los propágulos logrado por la etiolación. A través de los estudios anatómicos se observó en este trabajo un menor grado de lignificación y discontinuidad del anillo esclerenquimático en las miniestacas de primavera, en relación a las de otoño (Figura 2.2). Presentando las miniestacas de otoño el anillo esclerenquimático continuo y de mayor espesor (mayor grado de lignificación).

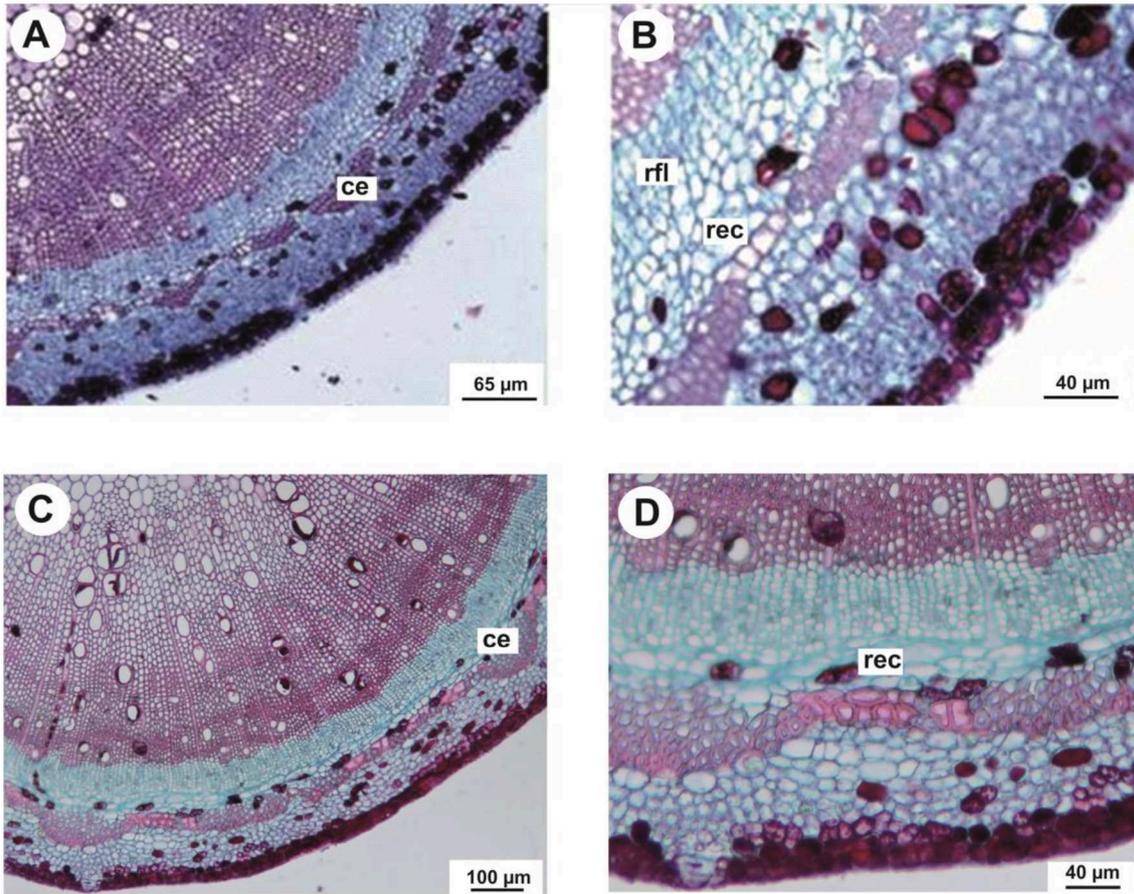


Figura 2.2.- Región basal de las miniestacas de *Prosopis alba* en primavera (A, B) y en otoño (C y D). Referencias: casquete de esclerenquima (ce); región entre casquetes de esclerenquima (rec); radio floemático (rfl).

La etiolación está directamente relacionada con el grado de lignificación y genera alteraciones fisiológicas del propágulo, todo lo cual influye en el enraizamiento (Maynard y Bassuk, 1988). Bassuk y col. (1985) demostraron que la práctica de etiolación en plantas madres de *Fagus sylvatica*, *Carpinus betulus* y *Pinus strobus* L. incrementó significativamente el enraizamiento de estacas de estas especies. Borges y col. (2011) observaron en su trabajo en miniestacas de híbridos de *E. globulus* que la menor lignificación de los tejidos promovió tasas superiores de enraizamiento. En *Tilia cordata*, *T. europaea*, y *T. tomentosa* el menor grado de lignificación benefició el enraizamiento (Maynard y Bassuk, 1988). La época del año se encuentra relacionada con la consistencia del leño, afectando el potencial de formación de raíces,

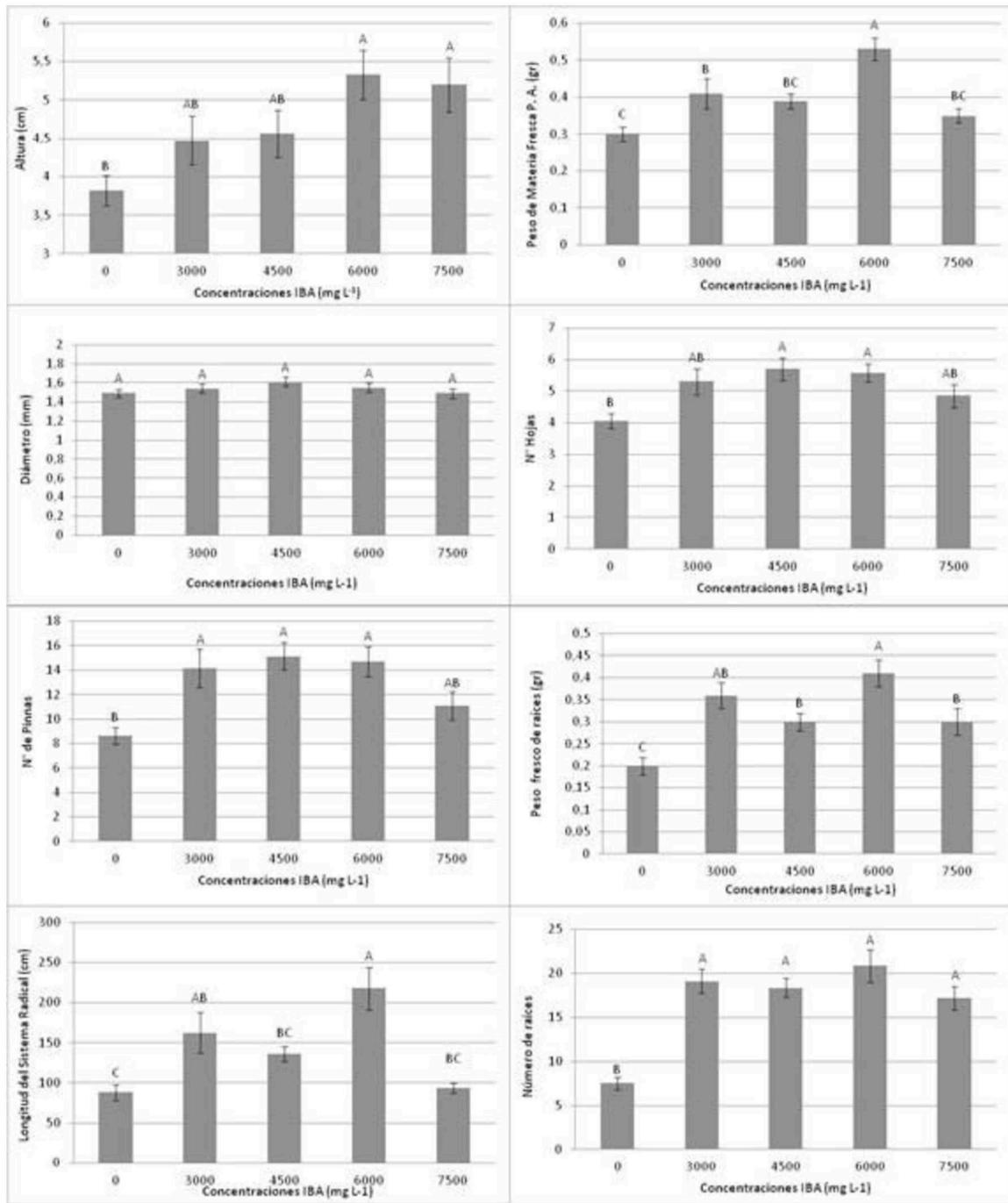
principalmente en especies de difícil enraizamiento (Lima y col., 2011). Estos mismos autores concluyeron que la época del año más promisoro para el enraizamiento de estacas de *Maytenus muelleri* Schwacke fue verano debido a la menor lignificación de los ramos en el período de intenso crecimiento vegetativo. Caro y col. (2002) en la propagación in vitro de *P. chilensis* sugieren que para que se produzca el enraizamiento es necesario una discontinuidad en el anillo de esclerenquima que permita el crecimiento y pasaje a través del anillo del primordio radical en crecimiento. A su vez en esta tesis (Cap. 3) se observó la influencia del grado de lignificación y de la discontinuidad del anillo esclerenquimático sobre el enraizamiento de los propágulos (miniastacas y estacas) de *P. alba* en ensayos realizados en el año 1 y 2, ambos en primavera, concluyendo que cuanto menor resulta el grado de lignificación y mayor es la discontinuidad del anillo esclerenquimático, mejores son las tasas de enraizamiento (Souza y col., 2013).

Además en este trabajo se observó que en primavera la utilización de IBA no afectó el porcentaje de enraizamiento, aunque influyó en todos los parámetros de calidad de los plantines evaluados excepto en el diámetro de plantines (Figura 2.3). La aplicación de IBA aumentó la velocidad, calidad y uniformidad del enraizamiento. La aplicación de auxinas favorece el enraizamiento de clones de especies forestales (Titon y col., 2003; Goulart y col., 2008; Brondani y col., 2010).

La utilización de IBA afectó el número de hojas y foliólulos, número, peso de materia fresca y longitud total de raíces (Figura 2.3). El aumento de la dosis de IBA ocasionó el aumento de los parámetros de calidad del plantín hasta la concentración de 6.000 mg L⁻¹. Se observó, sin embargo, en la dosis más alta (7.500 mg L⁻¹) una reducción en las variables de peso de materia fresca de la parte aérea, peso de la materia fresca y longitud de raíces (Figura 2.3). Un comportamiento similar fue observado por Oberschelp y Marcó (2010) en el enraizamiento de estacas herbáceas de *P. alba*, y por Goulart y col. (2008) en clones de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* propagados a través de miniastacas.

Oberschelp y Marcó (2010) no observaron diferencias significativas en las concentraciones de IBA utilizadas sobre el enraizamiento y altura de plantines de *P.*

alba en estacas semileñosas, y sobre altura en estacas herbáceas. Tampoco, la utilización del IBA influyó en el enraizamiento en híbridos de *E. globulus* (Borges y col., 2011) y en *Toona ciliata* (Souza y col., 2009).



Letras iguales sobre las medias de los tratamientos indican que no existen diferencias significativas al 5% de probabilidad según el Test de Tukey. Barras representan el Error Estándar de las medias.

Figura 2.3.- Efecto de la concentración de IBA sobre los parámetros de calidad de plantines clonales de *Prosopis alba* originados en primavera a los 40 días posteriores a la inducción del enraizamiento.

IV. CONCLUSIONES

Nuestras investigaciones permiten concluir que la época del año afecta el enraizamiento de las miniestacas de *P. alba*. Miniestacas originadas en primavera alcanzaron elevados porcentajes de enraizamiento y un mayor crecimiento y desarrollo de los plantines al ser tratadas con IBA. Contrariamente, en otoño no pudo observarse enraizamiento de miniestacas de *P. alba*.

CAPÍTULO 3

Aspectos Anatómicos de Miniestacas y Estacas de Prosopis alba y su Relación con la Capacidad de Enraizamiento



CAPÍTULO 3

Aspectos Anatómicos de Miniestacas y Estacas de Prosopis alba y su Relación con la Capacidad de Enraizamiento

RESUMEN

El objetivo de este capítulo fue analizar aspectos anatómicos, especialmente el grado de lignificación, de miniestacas y estacas de *Prosopis alba* y su relación con la capacidad de enraizamiento. Se realizaron cortes transversales seriados de miniestacas y estacas (con micrótopo de rotación y micrótopo de congelación), previo a la inducción del enraizamiento y 40 días posteriores al mismo. Se observaron en las miniestacas y estacas de *P. alba* que: (1) el anillo de esclerénquima compuesto está formado por dos regiones principales: los casquetes de esclerénquima y las regiones entre casquetes; (2) las regiones entre casquetes presentaban áreas de variable grado de esclerificación y, a veces regiones con células no esclerificadas; (3) cuanto menor fue el grado de lignificación de los materiales utilizados para la propagación, mayores fueron las discontinuidades en el anillo de esclerénquima; (4) miniestacas con mayor grado de juvenilidad y etiolación presentaron menor grado de lignificación y lograron mayores porcentajes de enraizamiento, generando plantines clonales con 96% de supervivencia y 99,6% de enraizamiento. El grado de lignificación del eje utilizado como propágulo influyó sobre el grado de enraizamiento alcanzado. Este trabajo permite afirmar que es posible realizar la propagación vegetativa de *P. alba* utilizando la técnica de miniestacas, sumada a la técnica de etiolación.

I. INTRODUCCIÓN

Prosopis alba Grisebach es una especie de gran importancia en la composición arbórea de zonas áridas y semiáridas (Felker y col., 2008; Ewens y Felker, 2010), siendo la especie de mayor importancia económica dentro del género (Giménez y col., 1998; Galera, 2000). Desde el punto de vista productivo resulta muy conveniente la propagación vegetativa de esta especie; pero hasta el momento no se han obtenido resultados concretos en términos de eficiencia y viabilidad de protocolos de establecimiento, desarrollo, regeneración y conservación de *P. alba* (Tabone y col., 1986; Felker y col., 1994; Castillo de Meier y Barceló Muñoz, 2002; Felker y col., 2005; Castillo de Meier y Vega, 2006; Felker y col., 2008).

En la propagación de especies leñosas el desarrollo de raíces adventicias es un factor clave para el éxito de la propagación (Davies Junior y col., 1982; Hartmann y col., 2002). En los procesos de enraizamiento de estacas es necesario conocer si existen barreras mecánicas que puedan influenciar la capacidad de formar raíces. Muchas especies presentan, lindante con las capas más internas del córtex, una capa completa o discontinua de células de esclerénquima, formando un anillo (Esau, 1977; Mauseth, 1988; Evert, 2006). Según algunos autores, el grado de esclerificación de esta capa está negativamente correlacionado con la capacidad de formar raíces (Beakbane, 1961; Esau, 1977; Davies Junior y Hartmann, 1988; Caro y col., 2002).

Para Metcalfe y Chalk (1957) el anillo de esclerénquima puede ser continuo o aparecer interrumpido. Su estructura y continuidad varía en diferentes estadios de desarrollo de una misma especie. Sin embargo, en *Camellia sinensis* L. el anillo de esclerénquima por fuera del floema no dificulta el desarrollo ni el pasaje del primordio radical adventicio en crecimiento (Koyuncu y Balta, 2004). En *Prosopis chilensis* Caro y col. (2002) determinaron que el enraizamiento logrado se relaciona con discontinuidades en el anillo de esclerénquima ubicado internamente al córtex radical.

Las técnicas de etiolación, posiblemente permitirían la obtención de mejores resultados en la propagación de especies nativas de difícil enraizamiento (Biasi, 1996).

Como parte de investigaciones sobre rizogénesis en *P. alba*, este trabajo propone estudiar aspectos anatómicos de miniestacas y estacas, previo y posterior al enraizamiento, especialmente en lo que respecta al desarrollo y estructura del anillo de esclerenquima, y a la relación del grado de lignificación de las estacas y miniestacas con el enraizamiento de las mismas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Formación, manejo y evaluación del jardín y minijardín clonal

El minijardín clonal fue implantado en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 14 h, intensidad de radiación 400 mE PAR, temperatura día/noche 26/19 °C y humedad relativa del ambiente 60%. En los 2 primeros años de su implantación las plantas madres fueron mantenidas en estas condiciones y posterior a este período fueron trasladadas al invernadero del área experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral (Latitud 31° 26'31'' S y Longitud 60°56'25'' O), donde se sometieron a temperaturas día/noche 26/15 °C y humedad relativa del ambiente 71,5%.

Las plantas madres del jardín y minijardín clonal fueron originadas de plantas provenientes de rodal semillero de la localidad de Vera (norte de la provincia de Santa Fe, Argentina) - (Latitud 29° 27'55'' S y Longitud 60°12'58'' O).

La metodología descrita por Souza y col. (2009), con modificaciones, fue utilizada para formar el minijardín clonal. Las plantas madres fueron cultivadas en macetas de 276.5 cm³ con sustrato de compost de residuos sólidos urbanos con 1/4 de arena gruesa (Humedad: 45%; Ph: 7,1; N Totales: 0,9%; P₂O₅: 0,9 %; K₂O: 0,6%). La densidad inicial empleada para su formación fue de 40 plantas por m². Posterior al establecimiento de las plantas madres y cuando las mismas presentaban en su totalidad

altura superior a 15 cm fue realizado el corte a 20 cm de la base del tallo de las plantas para promover el rejuvenescimiento de estas. Las plantas madres fueron fertilizadas con 3 ml de solución Hoagland al ½ (Hoagland y Arnon, 1950) a cada 15 días y también en el día anterior a la colecta de los brotes. El minijardín clonal quedó constituido por 55 plantas madres (minicepas), siendo cada una un genotipo de medio hermanos, donantes de propágulos, distribuidas en 5 parcelas, con 11 plantas madres cada una, dispuestas al azar, con minicepas de un año y medio en el ensayo “año 1” y de dos años y medio de edad en el ensayo “año 2”.

El jardín clonal fue implantado a campo y compuesto por 40 plantas madres distribuidas aleatoriamente en 4 parcelas (con 10 plantas madres cada una), con una distribución espacial de 3 x 3 m.

II.2. Preparación y evaluación de miniestacas y estacas

Para la preparación de las miniestacas y estacas se empleó la metodología descrita por Souza y col. (2009), con modificaciones. Se realizó la cosecha de brotes juveniles del jardín clonal y brotes rejuvenecidos del minijardín clonal para inducción del enraizamiento de *P. alba*. Se utilizó una porción del brote de primavera del mismo año, abarcando la yema apical y al menos 3 entrenudos de aproximadamente 6 cm de largo y se la conservó con 2 o 3 hojas de las cuales sus foliólulos fueron reducidos al 50% de su área total. A continuación, fueron sometidas a la aplicación del fungicida CHEMCARB® (carbendazim 50%) de la empresa CHEMIPLANT diluido a 2,5 cm³ L⁻¹).

Las miniestacas y estacas fueron sometidas a 5 tratamientos con ácido indolbutírico (IBA) solubilizado en hidróxido de potasio (KOH 1 mol L⁻¹), aplicado por vía líquida en la base de cada miniestaca y de cada estaca durante 15 segundos, a las concentraciones de: 0, 3.000, 4.500, 6.000 y 7.500 mg L⁻¹.

Posteriormente, se realizó el estaqueado de las estacas y miniestacas en tubetes plásticos de 110 cm³ de la empresa Dassplastic conteniendo substrato comercial número

2 de Dynamics® de la empresa Agri Service, fertilizado cada 15 días con 2 ml por tubete de solución nutritiva Bolle Jones (Chaves y col., 2006).

Los tubetes fueron transferidos a cámara de enraizamiento con nebulización intermitente y con humedad superior a 80%, temperatura media máxima de 34,86°C, temperatura media de 23,57, radiación solar 20,48 mJ m⁻² día y heliofanía efectiva promedio de 9,32 h día⁻¹.

A los 40 días se determinó la supervivencia y el porcentaje de miniestacas y estacas enraizadas.

Los experimentos de enraizamiento de miniestacas y estacas fueron dispuestos en un diseño de cuatro bloques aleatorizados con 5 tratamientos de IBA, y 9 plantines clonales por unidad experimental.

Los ensayos de miniestaqueado y estaqueado fueron realizados en primavera de dos años consecutivos (“año 1” y “año 2”).

La densidad de plantas madres donantes de propágulos en el minijardín clonal en los ensayos del año 1 fue de 40 plantas m⁻².

Con la intención de promover una mayor etiolación en el material a ser propagado, en los ensayos del “año 2” la densidad de las plantas madres se aumentó a 256 plantas m⁻² y, los brotes, a partir de los 10 cm de longitud, fueron sometidos a sombreado total.

II.3. Aspectos anatómicos

Muestras de miniestacas y estacas de todos los tratamientos fueron tomadas para los estudios anatómicos, previo a la inducción del enraizamiento y 40 días después de acondicionadas en cámara de enraizamiento. Se tomaron muestras de 0,5 cm de la porción basal de miniestacas y estacas. La mitad de ellas fue fijada en FAA (formol: ácido acético: etanol 70%, 10: 5: 85, v/v/v) y la otra mitad, conservadas en freezer.

Las muestras fijadas en FAA fueron deshidratadas en una serie creciente de graduaciones de alcohol etílico, clarificadas con xilol e incluidas en parafina (Johansen, 1940; Ruzin, 1999). Luego, mediante un micrótopo rotativo se realizaron cortes transversales seriados de 12-15 μm de espesor, los que fueron coloreados con safranina-fast green y montados en bálsamo de Canadá (D'Ambrogio de Argüeso, 1986).

De las muestras conservadas en freezer se obtuvieron cortes transversales seriados de 10 μm de espesor, mediante micrótopo de congelación y fueron clarificados con solución de hipoclorito de sodio, lavados en agua y montados en fluoroglucinol-ácido clorhídrico para observar el grado de lignificación de los tejidos de los diversos tipos de miniestacas y estacas (Johansen, 1940; Kraus y Arduin, 1997).

Además se tomaron muestras de la región apical, proximal, media y basal de brotes que fueron utilizados para la preparación de las miniestacas y estacas. Éstas fueron fijadas en FAA, deshidratadas en una serie creciente de alcohol etílico, incluidas en parafina, cortadas con micrótopo de rotación (cortes transversales seriados) y procesadas como se indicó anteriormente.

III. RESULTADOS

En el ensayo de primavera del “año 1” (con utilización de brotes más lignificados), se logró un 20% de supervivencia de las miniestacas y 12.5% de enraizamiento de las mismas. En dicho ensayo no se observó enraizamiento de las estacas, habiéndose registrado sólo un 8% de supervivencia de las mismas (Tabla 3.1).

Se observó que el enraizamiento de las miniestacas del “año 1”, (con mayor grado de lignificación que las del “año 2”) se dio solamente en la región del nudo o en regiones cercanas al corte, dañadas accidentalmente durante su preparación.

En el ensayo de miniestacas de primavera del “año 2”, con utilización de brotes menos lignificados, se logró 96% de supervivencia de las miniestacas y 99,6% de

enraizamiento. De las estacas del jardín clonal se logró 20% de supervivencia y 7.57% de enraizamiento.

El porcentaje de enraizamiento evaluado a través de la técnica de miniestacas en el ensayo de primavera del año 2 fue del 100% para las concentraciones 0, 3.000, 4.500 y 6.000, y de 98% para la concentración de 7.500 (mg L^{-1}) de IBA (Tabla 3.1).

Tabla 3.1.- Porcentajes de supervivencia y enraizamiento (ENR) en los ensayos de miniestacas y estacas en los años 1 y 2.

| “Año 1” (no sometidas a etiolación: presentaron mayor grado de lignificación) | | | | “Año 2” (sometidas a etiolación: presentaron menor grado de lignificación) | | | |
|---|-------|---------|-----|--|-------|---------|-------|
| Miniestacas | | Estacas | | Miniestacas | | Estacas | |
| SUPERV | ENR | SUPERV | ENR | SUPERV | ENR | SUPERV | ENR |
| 20% | 12.5% | 8% | 0% | 96% | 99,6% | 20% | 7.57% |

No se observaron diferencias en función de las concentraciones de IBA en el porcentaje de enraizamiento ni en el grado de lignificación del anillo de esclerénquima en estacas y miniestacas.

En los cortes transversales de la región apical de brotes rejuvenecidos de plantas del minijardín clonal (de los cuales se extrajeron propágulos para preparación de miniestacas) se observó una epidermis uniestratificada, una capa subepidérmica de colénquima, pocas capas de clorénquima, algunas células taníferas, una capa cortical interna de células grandes (vainas amilíferas), el anillo de esclerénquima en formación, los haces vasculares colaterales y una región medular con células grandes en comparación con el tamaño de las células del córtex (Fig. 3.1.- A, B).

En los cortes seriados desde el ápice hacia la base fue aumentando el número de haces vasculares en formación, apareciendo diferenciados, en primer lugar, elementos de floema y luego elementos de xilema y a un mismo nivel se observaron haces vasculares en diferentes estadios de diferenciación (Fig. 3.1.- B, C).

A medida que se avanzó en los cortes seriados de porciones apicales de un brote se observó tempranamente la aparición de cambium vascular dentro de los haces vasculares más grandes, y más tardíamente en los medianos y pequeños; presentándose áreas interfasciculares sin cambium vascular notable (Fig. 3.1.- B, C). En paralelo con la diferenciación de cada haz vascular se fue diferenciando un grueso casquete floemático de esclerénquima. Las células más externas del mismo fueron las que primero engrosaron sus paredes; las células más internas a éstas persistieron mayor tiempo como células de paredes delgadas (Fig. 3.1.- C).

Finalmente en regiones más basales del brote todo el casquete floemático de fibras presentó paredes celulares gruesas y esclerificadas (Fig. 3.1.- F). En general los casquetes de esclerénquima fueron aumentando de tamaño proporcional al tamaño que fue tomando el haz vascular. Las células que formarían, en regiones más diferenciadas, el anillo de esclerénquima, mostraron en las regiones apicales una estructura constituida por casquetes floemáticos unidos por regiones de menor número de estratos celulares (Fig. 3.1.- E, F).

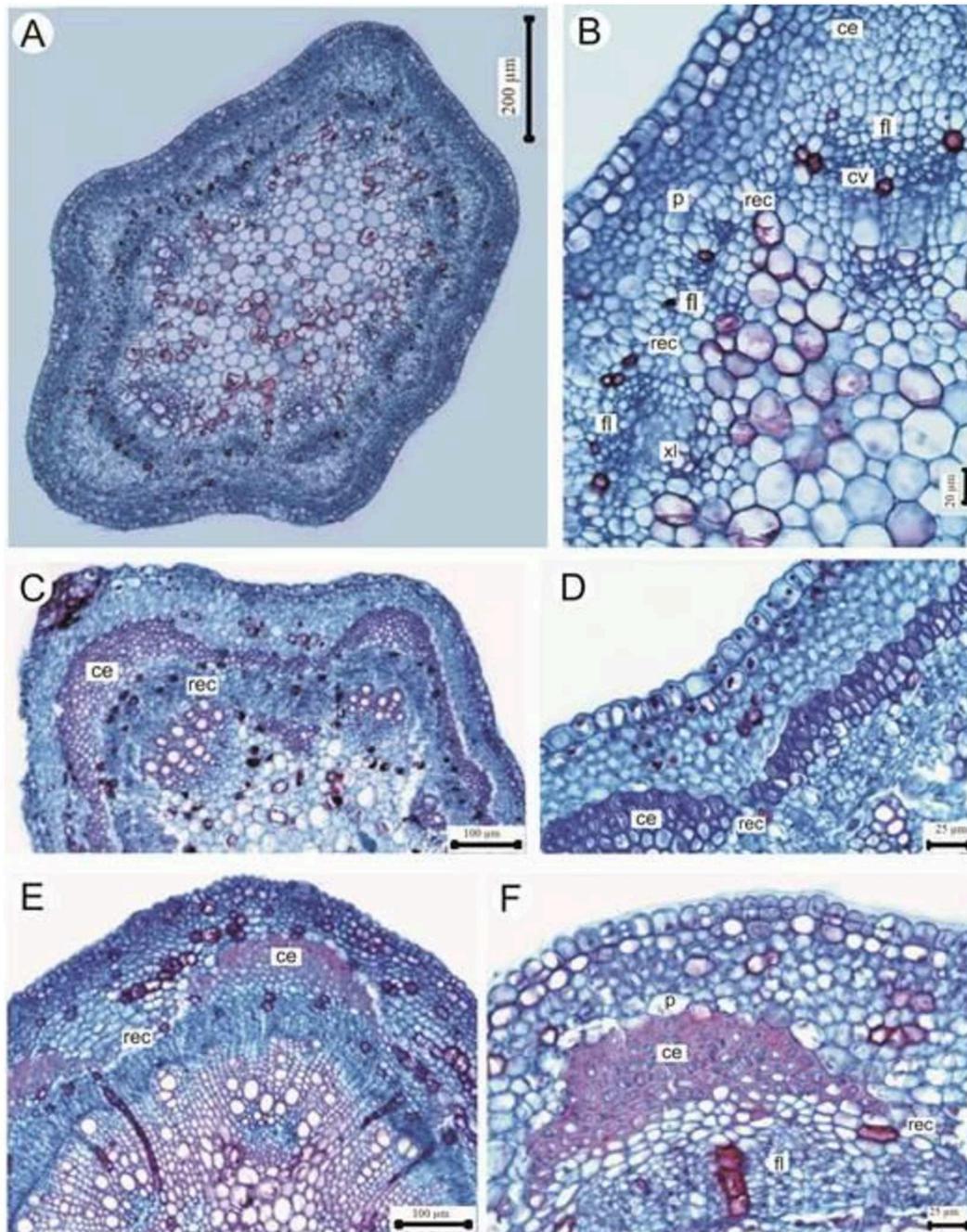


Figura 3.1.- Brote rejuvenecido de planta madre del minijardín clonal de *P. alba* de los cuales se extrajeron propágulos para preparación de miniestacas. A y B: Corte transversal de entrenudo de la región apical. C y D: Región media del brote; E y F: Región basal del brote. Referencias: casquete de esclerénquima (ce); cambium vascular (cv); floema (fl); periciclo (p); región entre casquetes de esclerénquima (rec); xilema (xl).

Con el incremento del crecimiento secundario se observó la típica estructura de las especies leñosas, en las cuales el cambium vascular se dispone entre anillos de xilema secundario hacia el interior del órgano, y floema secundario hacia el exterior (Fig. 3.1.- E, F). Se observó que el xilema secundario en las regiones fasciculares era de estructura diferente al xilema secundario de las regiones interfasciculares. En estas últimas zonas se presentó menor proporción de vasos y se fueron diferenciando los radios vasculares (Fig. 3.1.- F). Las células de los radios xilemáticos esclerificaron sus paredes, en tanto que los radios floemáticos permanecieron parenquimáticos y se fueron ensanchando radialmente hacia la periferia (Fig. 3.1.- F). Por fuera del floema secundario apareció el anillo de esclerénquima formado por los casquetes de esclerénquima y regiones entre dichos casquetes (Fig. 3.1.- F), los que estaban formados por varias capas de fibras de pequeño diámetro y gruesas paredes fuertemente lignificadas. Las regiones entre casquetes presentaban 1-2 capas de células grandes de paredes más delgadas y menos lignificadas y algunas células no lignificadas (Fig. 3.2.- A, B). Las regiones entre casquetes se asociaron a regiones lindantes con las áreas interfasciculares y con la parte distal de los radios floemáticos. Estas regiones aparecieron como posibles discontinuidades en el anillo de esclerénquima en material menos lignificado. El espesor y el grado de lignificación de las paredes celulares entre los casquetes de esclerénquima, aumentó hacia la base de la miniestaca.

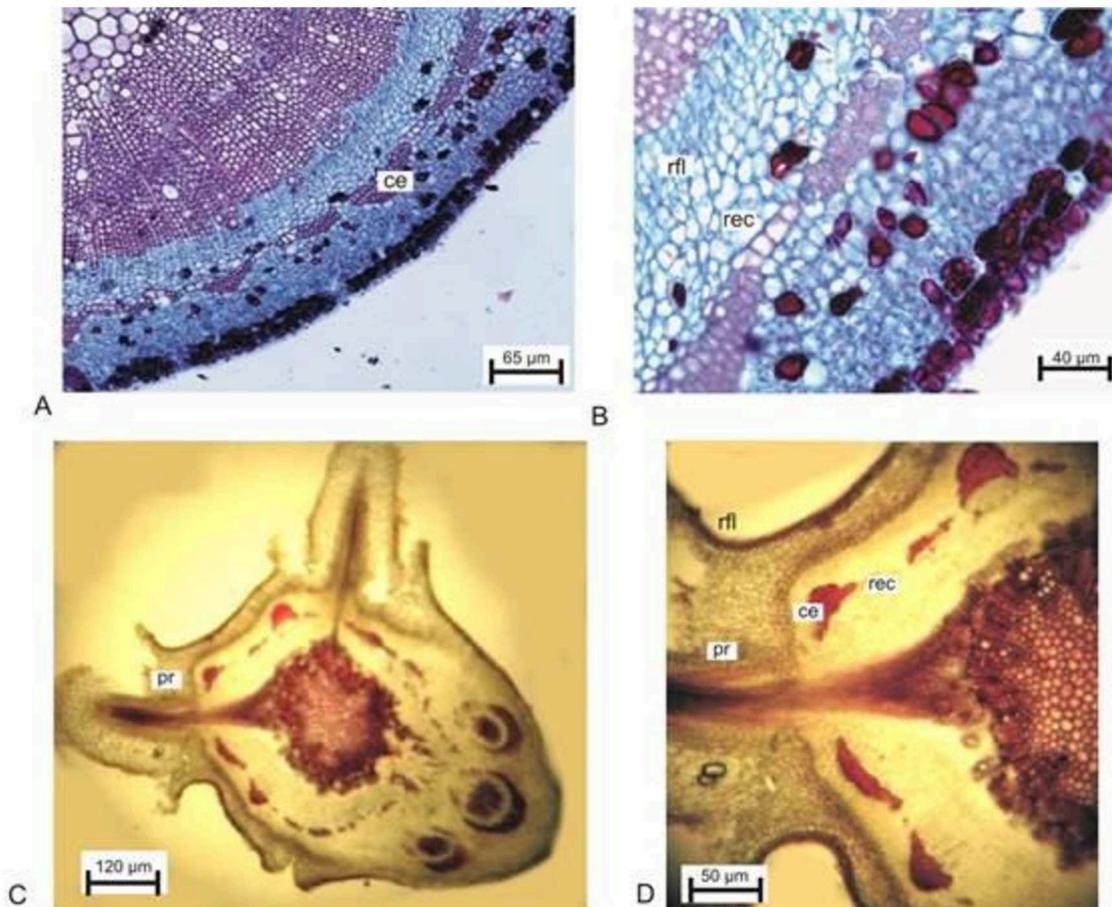


Figura 3.2.- Miniestacas de *P. alba* año 1. A: Corte transversal de entrenudo de miniestaca antes de iniciar los ensayos de enraizamiento; B: Detalle ampliado de A; C: Miniestaca enraizada; D: Detalle ampliado de C. Referencias: casquete de esclerenquima (ce); región entre casquetes de esclerenquima (rec); radio floemático (rfl); primordio radical (pr).

El grado de lignificación de los casquetes de esclerénquima y de las regiones entre casquetes fue mayor en las estacas respecto de las miniestacas (Fig. 3.3). Del mismo modo dicho grado de lignificación fue mayor en las miniestacas y estacas del primer año, respecto a las del segundo, lo cual se debió a las condiciones de etiolación de estas últimas (sombreado total y densidad de plantas madres) (Fig. 3.3.- C, D, E). Es posible que estas diferencias observadas en el grado de lignificación de las estacas y miniestacas hayan determinado un incremento en el enraizamiento, tanto en porcentaje como en número y longitud total de raíces (Fig. 3.3.- C, D).

En las miniestacas se observó enraizamiento en las regiones que mostraron menor grado de lignificación en las paredes celulares de las regiones entre casquetes de esclerénquima. Para las mismas condiciones de enraizamiento miniestacas de *P. alba* que presentaban mayor grado de lignificación en esas regiones no enraizaron (Fig. 3 D).

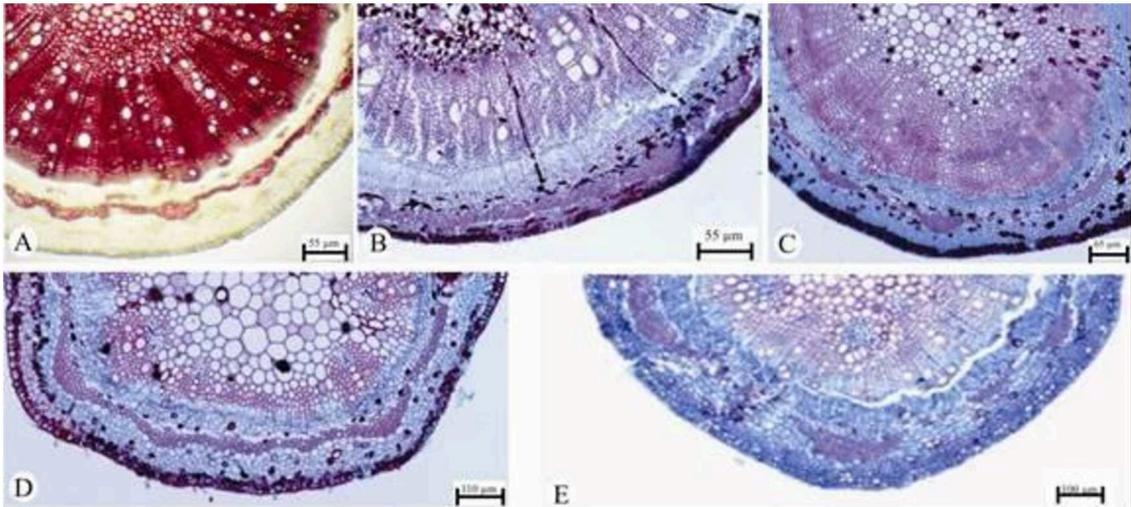


Figura 3.3.- Variaciones en los grados de lignificación y discontinuidad de los anillos esclerenquimáticos de miniestacas y estacas de *P. alba*. A: Miniestaca del año 1 que no enraizó; B: Estaca del año 1, con mayor grado de lignificación, que no enraizó; C: Miniestaca del año 1, con menor grado de lignificación, que enraizó y que presentó mayor producción de raíces a los 40 días; D: Miniestaca del año 1 con mayor grado de lignificación, que enraizó pero que presentó baja producción de raíces a los 40 días; E: Grado de lignificación de miniestaca del año 2, crecida en mayor condición de etiolación y que presentó 99,6 % de enraizamiento.

En estacas y miniestacas de *P. alba* en las que se logró el desarrollo de raíces adventicias se observó que los primordios radicales atravesaban el anillo de esclerenquima compuesto a través de las regiones entre casquetes de esclerenquima. (Fig. 3.2.- C, D).

Las diferencias en la anatomía de las estacas y miniestacas de *P. alba* se relacionaron con variaciones en el grado de lignificación del anillo de esclerenquima. El porcentaje de enraizamiento logrado se relacionó directamente con el grado de lignificación del propágulo utilizado; cuanto menor fue el grado de lignificación de los brotes utilizados para propagación mayores fueron las tasas de enraizamiento.

VI. DISCUSIÓN

La formación de raíces adventicias es un paso necesario en la propagación vegetativa. De ahí el interés que este proceso tiene tanto para la Silvicultura, como para la horticultura y la fruticultura (Oinam y col., 2011). La incapacidad de desarrollar raíces adventicias desde estacas que tienen ciertas especies o la pérdida de dicha capacidad que ocurre con la edad de la planta ocasiona serias pérdidas económicas en la producción de especies forestales (Pijut y col., 2011). Es por todo ello que el proceso de rizogénesis ha interesado a numerosos campos de las ciencias y existen numerosas revisiones que muestran los avances en la biología de la formación de raíces adventicias (Altamura, 1996; De Klerk, 2002; Geiss y col., 2009; Kurepin y col., 2011; López-Villalobos y col., 2011; Oinam y col., 2011). Dentro de las investigaciones realizadas los estudios histológicos, tanto de los ejes como del desarrollo de los primordios radicales, constituyen una invaluable base de conocimiento para entender la formación de las raíces adventicias (Gahan y George, 2008; Oinam y col., 2011).

El corte transversal del entrenudo de regiones apicales de los brotes rejuvenecidos de plantas madres del minijardín clonal de *P. alba* mostró haces vasculares en diferentes estadios ontogénicos (Fig. 3.1.- C). Esto fue debido por un lado a variaciones en el patrón de diferenciación de xilema y floema (Esau, 1965); y, por

otro, al inicio del crecimiento secundario que se produce muy próximo a las regiones apicales en la mayoría de las especies leñosas (Philipson y col., 1971).

En las miniestacas de *Prosopis alba* apareció internamente en el cortex un anillo de esclerénquima (Fig. 3.2, Fig. 3.3), una estructura encontrada en la mayoría de las dicotiledóneas leñosas (Esau, 1977; Duarte y Wolf, 2005; Ló y Duarte, 2011). En los brotes rejuvenecidos de *P. alba* el denominado anillo de esclerénquima estaba formado por dos regiones: los casquetes de esclerénquima y las regiones entre casquetes (Fig. 3.1, Fig. 3.2, Fig. 3.3). Las discontinuidades en el anillo de esclerénquima se completaron con parénquima que puede diferenciarse en células de gruesas paredes celulares. Estas discontinuidades producidas por la presencia de células de parénquima no lignificadas o con menor grado de lignificación, se dieron en determinados estadios de diferenciación y fueron disminuyendo hasta desaparecer hacia la base de la rama (Fig. 3.1), como fue descrito para otras especies leñosas (Hicks y Gladstone, 1971; Amisshah y col., 2008).

En las miniestacas de *P. alba* que enraizaron se observó que los primordios radicales atravesaban el anillo de esclerénquima compuesto a través de las regiones entre casquetes de esclerénquima (Fig. 3.2.- C, D), es decir, se observó enraizamiento en la región del anillo con menor grado de lignificación. En *P. chilensis* (Caro y col., 2002) y en *Olea europea* (Peixe y col., 2007) el enraizamiento logrado se relacionó con discontinuidades en el anillo de esclerénquima ubicado internamente al cortex radical. Para las mismas condiciones de enraizamiento, miniestacas de *P. alba* que presentaban mayor grado de lignificación en esas regiones no enraizaron; resultado también observado en otras especies leñosas (Beakbane, 1961; Doud y Carlson, 1977; Maynard y Bassuk, 1996; Syros y col., 2004; Bastos y col., 2005; Amisshah y col., 2008; Elbasheer y Elkalifa, 2010).

En tanto que Sachs y col. (1964) no encontraron relación entre la facilidad de enraizamiento y la densidad y continuidad del anillo de esclerénquima en estacas de diferentes cultivares de pera y olivo. Ellos notaron una importante expansión y proliferación celular en el cortex, floema y cambium vascular, lo que no fue suficiente para causar discontinuidades en el anillo de esclerénquima. En *Camellia sinensis* L. el

anillo de esclerénquima no se comportó como una barrera mecánica en el momento de producirse el desarrollo de las raíces adventicias (Koyuncu y Balta, 2004).

Beakbane (1961) y Edwards y Thomas (1980) han sugerido que la presencia de una capa continua de esclerénquima podría actuar como una barrera fisiológica a la iniciación de las raíces adventicias más que como una barrera mecánica a la emergencia radical. Por otra parte Davies Junior y col. (1982) y Amissah y col. (2008) han considerado que las diferencias en el proceso de enraizamiento estaban más relacionadas con la facilidad de iniciación de raíces que con restricciones a su emergencia debidas al anillo de esclerénquima.

Borges y col. (2011), han observado, trabajando con híbridos de *Eucalyptus globulus*, que las miniestacas obtenidas de la región apical de los brotes presentaban menor lignificación de los tejidos y tasas mayores de enraizamiento, tal como lo observado en este trabajo en *P. alba*. El enraizamiento puede verse dificultado por cambios en el grado de maduración de los ejes o por condiciones ambientales (Hartmann y col., 2002; Meng y col., 2009; Rasmussen and Hunt, 2010; Oinam y col., 2011; Pijut y col., 2011).

La formación de raíces adventicias es un proceso organogénico complejo que está afectado por la interacción de factores endógenos, tales como las hormonas vegetales y los carbohidratos, y por factores ambientales tales como la luz (Sorin y col., 2005; Druemme y col., 2008; Ahkami y col., 2009; Bennett y Scheres, 2010; Kitomi y col., 2011; Verstraeten y col., 2013). En relación con ello se conoce que las condiciones ambientales y prácticas de manejo modifican los porcentajes de enraizamiento logrados (Rasmussen y col., 2009; Regonezi y col., 2010). Algunos de estos cambios pueden modificar el grado de lignificación de los eje (Hartmann y col., 2002; Hatzilazarous y col., 2009). Cuando estos cambios modifican el grado de lignificación de las regiones entre casquetes de esclerénquima, modifican consecuentemente el porcentaje de discontinuidades en el anillo de esclerénquima (Maynard y Bassuk, 1996; Amissah y Bassuk, 2007; Amissah y col., 2008). Las diferencias entre estacas y miniestacas de *P. alba* con relación a la lignificación del anillo (Fig. 3) estuvieron relacionadas a la etiolación, causada por la ausencia de luz. La generación de materiales juveniles a

través de técnicas *in vitro* o usando métodos *ex vitro* como la etiolación (De Klerck, 2002) condujeron a una exitosa formación de raíces adventicias. La etiolación se caracteriza por alteraciones fisiológicas asociadas a una reducción de la lignificación de los tejidos (Doud y Carlson, 1977; Maynard y Bassuk, 1996; Hartmann y col., 2002; Amissah and Bassuk, 2007; Amissah y col., 2008).

En *P. alba* la etiolación, al reducir la lignificación ha incrementado el porcentaje de discontinuidades del anillo de esclerénquima y ha incrementado las tasas de enraizamiento, tal como fuera planteado para otras especies leñosas (Maynard y Bassuk, 1996; Amissah y Bassuk, 2007; Amissah y col., 2008).

VII. CONCLUSIÓN

En las miniestacas y estacas de *P. alba* el anillo de esclerénquima estaba formado por dos regiones principales: los casquetes de esclerénquima y las regiones entre casquetes. Estas regiones entre casquetes presentaban áreas de variable grado de esclerificación y, a veces regiones con células no esclerificadas. Cuanto menor fue el grado de lignificación de los materiales utilizados para la propagación, mayores fueron las discontinuidades en el anillo de esclerénquima y mayor el grado de enraizamiento logrado. Miniestacas con mayor grado de juvenilidad y etiolación presentaron menor grado de lignificación y lograron mayores porcentajes de enraizamiento, generando plantines clonales con 96% de supervivencia y 99,6% de enraizamiento.

Este trabajo permite afirmar que es posible realizar la propagación vegetativa de *P. alba* utilizando la técnica de miniestacas, sumada a la técnica de etiolación.

CAPITULO 4

Caracterización genética de las plantas madres y clones de *Prosopis alba* propagados a través de la técnica de miniestacas



RESUMEN

La producción de especies forestales de *Prosopis alba* provee materia prima para cadenas industriales y además permite una producción sustentable. La especie es de gran importancia para la producción en zonas áridas y semiáridas del mundo. La especie es la de mayor importancia económica dentro del género. Existe una alta variabilidad genética de la especie y una alta capacidad de hibridaciones interespecíficas. Recientemente se ha desarrollado un protocolo de clonación de familia elites de *Prosopis alba* mediante la técnica de miniestacas. La caracterización genética es fundamental para realizar la identificación precisa de los clones. Este trabajo tuvo el objetivo de caracterizar genéticamente los clones de *Prosopis alba*, propagados mediante la técnica de miniestacas, a través de Análisis de Microsatélites. Otro objetivo de este trabajo fue caracterizar genéticamente los árboles plus del rodal semillero de la cuña boscosa santafesina que dieron origen a las plantas madres del minijardín clonal de *Prosopis alba*, mediante Análisis de Isoenzimas Alcohol Deshidrogenasa (ADH).

Para el primer caso los primers utilizados fueron 5 microsatélites o SSR diseñados para *Prosopis* por Mottura et al 2005. Estos marcadores moleculares fueron amplificados mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Posteriormente, los productos de esta amplificación fueron separados en geles de agarosa y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio.

Se observó un 82% de amplificación con los primers evaluados. Para determinar la similitud genética y el agrupamiento de los clones se aplicaron los procedimientos del paquete estadístico NTSyS. Fue posible realizar la identificación genotípica del material clonado y la diferenciación de todos los clones evaluados.

I. INTRODUCCIÓN

El género *Prosopis* Linnaeus emend. Burkart pertenece a la familia Fabáceae, subfamilia Mimosoideae. Es dividido en cinco secciones: *Prosopis*, *Anonychium*, *Strombocarpa*, *Monilicarpa* y *Algarobia*. La sección *Algarobia*, y en cinco series *Sericanthae*, *Ruscifoliae*, *Denudantes*, *Humiles*, *Pallidae* y *Chilenses*. En Argentina existen representantes de las secciones *Strombocarpa*, *Monilicarpa* y *Algarobia* con un total de 27 especies, perteneciendo la mayoría de las especies a la sección *Algarobia* (presentando 21 de las 27 especies) (Burkart, 1976; Palacios y col., 1988).

Este género posee especies arbóreas que son de gran interés económico y ecológico entre las especies forestales de Argentina. Estas son consideradas por la FAO como especies de usos múltiples por sus innumerables usos tanto en productos madereros de propiedades excepcionales como así también productos no madereros de excelente calidad. Además son especies importantes en regiones áridas y semiáridas de las Américas, África y Asia, presentando gran resistencia a la sequía y también a la salinidad. Tienen capacidad de adaptarse a suelos y climas inhóspitos. Poseen una alta palatabilidad como forraje, una alta capacidad de rebrote y resisten a podas y al pastoreo, siendo usadas en la alimentación animal y humana. Presentan genotipos con muy buenas tasas de crecimiento, alta productividad, resistentes a plagas y enfermedades. Además, presentan alta capacidad de fijación de nitrógeno. (Arce y col., 1990; De Melo Araujo, 1997; Arce y Medina, 1997; Lima, 1999; Julio, 2000; Prokopiuk y col., 2000; Felker y col., 2008; Bessega y col., 2013).

Sin embargo, este recurso forestal madero para fines de producción de muebles rústicos, aberturas, parquets, productos de carpintería rural, postes, leña, carbón, etc. proviene principalmente, de la explotación predatoria y no sostenible de los montes nativos (Patch y Felker, 1997). Esto se observa aún actualmente, con una producción que no se preocupa por el medio ambiente, haciendo el uso de mano de obra no reglamentada, con bajas remuneraciones y con condiciones no adecuadas de trabajo.

Estas especies han sido utilizadas y recomendadas para forestar regiones áridas y semiáridas del mundo en la implantación de bosques cultivados, cuyas las plantaciones son realizadas en sistemas puros o en consorcio con actividades ganaderas y/o agrícolas,

para así, suprimir la demanda forestal de este recurso. Estas acciones no solamente ofrecen rentabilidad al productor sino también ofrecen un producto, generado dentro de una producción ecológica y socialmente correcta, sin dejar de mencionar que contribuyen a la protección de los montes nativos.

A pesar de las presiones ambientales y de la necesidad de productos madereros para el mercado consumidor, los estudios realizados a la silvicultura de especies potenciales para la utilización de plantaciones forestales, recuperación de áreas degradadas y conservación de germoplasma están siendo producidos gradualmente (Dias y col., 2012).

Una de las especies de mayor importancia económica dentro del género es el *Prosopis alba* Grisebach (Algarrobo blanco) (Giménez y col., 1998). La especie pertenece a la sección *Algarobia* serie *Chilenses* en la clasificación de Burkart (1976). Para la implantación de bosques cultivados *Prosopis alba* se utilizan actualmente plantines originados mediante semillas, por los problemas inherentes a su difícil enraizamiento (Ewens y Felker, 2003; Ewens y col., 2012; Souza y col. 2014).

Por su alto porcentaje de alogamia y por su gran capacidad de cruzamientos inter e intraespecíficos la especie presenta muy alta variabilidad genética, esto trae como consecuencia características silviculturales indeseables para la productividad, baja calidad y heterogeneidad de los rodales implantados (Simpson, 1977; Naranjo y col., 1984; Balboa y col., 1990; De Ataide, 1990; Arce y Medina, 1997; Verzino y Joseau, 2005).

Materiales altamente productivos de alta calidad y de homogeneidad, adaptados a condiciones edáficas y climáticas específicas y de resistencia a plagas y enfermedades y con un plazo más corto para la cosecha son de interés no solamente de los productores como principalmente para la industria que demanda éstos productos.

A pesar de la gran explotación de la especie, para suplir la demanda de productos derivados de la madera, no existe actualmente un programa de silvicultura clonal específico para la misma.

Por lo expresado anteriormente se observa la necesidad de desarrollar tecnologías de propagación clonal y programas de mejoramiento para producir rodales con estas características tan apreciadas por los productores y por la industria del sector forestal.

Entre las técnicas de clonación se destaca la técnica de miniestacas (Souza, 2009; Xavier y col., 2009, Goulart y Xavier, 2010; Dias y col., 2012).

La técnica de clonación de familias mediante la técnica de miniestacas se utiliza exitosamente en la clonación de materiales de difícil enraizamiento (Xavier y col. 2013). Por lo anterior, proponemos la aplicación de esta técnica para iniciar un programa de silvicultura clonal para esta especie. Ensayos de enraizamiento de propágulos de *Prosopis alba* logrados a través de estas técnicas fueron realizados por Souza y col. (2014) (parte de los trabajos realizados en esta tesis - capítulo 1) con resultados que demostraron la viabilidad de la misma.

La identificación de clones se ha basado tradicionalmente en descriptores morfológicos, fenológicos, fisiológicos y agronómicos. Sin embargo, esta identificación puede resultar ambigua e insuficiente para lograr una caracterización precisa de las variedades (Garay y col., 2009).

La variación genética fue alta para todos los caracteres analizados, en especies de *Prosopis alba* en el trabajo de Variación Genética de Progenies de esta especie realizado por López y col. (2001). Debido a la alta variabilidad y alto índice de cruzamientos interespecíficos, arboles con características morfológicas de *Prosopis alba* pueden en determinadas circunstancias corresponder a híbridos interespecíficos y constituir parte de enjambres híbridos entre varias especies del género. Es por ello que es importante determinar la identificación genética de los materiales clonados.

En la actualidad se utiliza, debido al desarrollo de una generación de descriptores, la técnica de marcadores moleculares (basadas en la manipulación del ADN) para una identificación genotípica precisa de especies forestales (Garay y col., 2009). Los marcadores moleculares permiten detectar diferencias o similitudes entre organismos más o menos relacionados entre sí. La técnica de huella dactilar del ADN (en inglés: DNA fingerprinting) basada en marcadores moleculares posibilita la

identificación de clones y la caracterización de variedades en los programas de mejoramiento genético, brindando un sistema de etiquetado molecular que permite asegurar una identificación genotípica confiable. Su poder de discriminación radica en las diferencias existentes a nivel del ADN y se emplea en el desarrollo de protocolos para la trazabilidad de los diferentes genotipos. Existen varios tipos de marcadores moleculares, siendo el de “microsatélites” o SSR uno de los más utilizados. El alto grado de polimorfismo, su característica de codominancia (pueden distinguirse los dos alelos de un mismo locus) y la alta reproducibilidad, proveen un sistema muy robusto para generar una identificación única de individuos (Dayanandan y col., 1998; Rahman y col., 2000; Torrez y col., 2008).

El presente trabajo tuvo el objetivo de realizar la caracterización genética de los clones de *Prosopis alba*, propagados mediante la técnica de miniestacas, a través de análisis de Microsatélites. También se realizó la caracterización genética de los árboles plus del rodal semillero de la cuña boscosa santafesina que dieron origen a las plantas madres del minijardín clonal de *Prosopis alba*, mediante Análisis de Isoenzimas Alcohol Deshidrogenasa (ADH).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de clones de *Prosopis alba* mediante Microsatélites

Las hojas jóvenes de las plantas madres del minijardín clonal de *Prosopis alba* de la FCA-UNL clonadas, fueron colectadas para extracción de ADN y conservadas en gel de sílice.

El ADN genómico total fue extraído de las hojas jóvenes utilizando el Kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany). La cuantificación de ADN fue realizado utilizando un espectrofotómetro.

Para el análisis genético se utilizaron 5 loci de microsatélites o SSR (Mo05, Mo07, Mo08, Mo09, Mo13) desarrollados por Mottura y col. (2005). Los primers utilizados presentan las secuencias de pares de bases observadas en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1.- Secuencias Pares de bases.

| Secuencias de Pares de bases: 5` to 3` | |
|---|-------------------------|
| Mo 05 F | AATTCTGCAGTCTCTTCGCC |
| Mo 05 R | GATCCCTCGTGACTCCTCAG |
| Mo 07 F | GAAGCTCCCTCACATTTTGC |
| Mo 07 R | CTATTTGCGCAACACACAGC |
| Mo 08 F | TATCCTAAACGCCGGGCTAC |
| Mo 08 R | TCCCATTCATGCATACTTAAACC |
| Mo 09 F | ATTCCTCCCTCACATTTTGC |
| Mo 09 R | CATTATGCCAGCCTTTGTTG |
| Mo 13 F | TTGATTAGAGTTGCATGTGGATG |
| Mo 13 R | TGCAGTCCCAAGTGTCAGAG |

Referencias: F: Forward; R: Reverse.

Tabla 4.2.- Protocolo PCR microsatélites, con un Mix para volumen final de 15 ul/muestra.

| | 1 muestra | 10 | 15 |
|-----------------------|------------------|-----------|-----------|
| H₂O | 4.70 | 47.00 | 70.50 |
| Buffer (10X) | 3.00 | 30.00 | 45.00 |
| pr(5uM) | 2.00 | 20.00 | 30.00 |
| pf (5uM) | 2.00 | 20.00 | 30.00 |
| dNTP`s(10mM) | 0.20 | 2.00 | 3.00 |
| TAQ | 0.10 | 1.00 | 1.50 |
| V. Total | 12.00 | 120.00 | 180.00 |

La amplificación del ADN se realizó en un volumen total de 15 µl, con 15 a 20 ng de ADN molde, 10 mM dNTP, , 5 µM de cada primer, 10x de buffer de reacción y 1 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen), en un termociclador Eppendorf (Mastercycler® personal). Los primers que fueron usados poseían fluorescencia, necesaria para una etapa posterior en el secuenciador de INTA- Castelar.

Las condiciones de la PCR en el termociclador para cada primer se detallan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3.- Datos de temperatura y ciclos de los primers cargados en el termociclador.

| TEMPERATURAS Y CICLOS DE LOS PRIMERS | | |
|---|-------------------|-------------------|
| Mo 05 | Mo 08 | Mo 13 |
| 1- T= 94° 5` | 1- T= 94° 5` | 1- T= 94° 5` |
| 2- T= 94° 45`` | 2- T= 94° 45`` | 2- T= 94° 45`` |
| 3- T= 64° 45`` | 3- T= 64° 45`` | 3- T= 58° 45`` |
| 4- T=72 ° 45`` | 4- T=59 ° 45`` | 4- T=72 ° 45`` |
| 5- Go to 2 REP 30 | 5- Go to 2 REP 30 | 5- Go to 2 REP 30 |
| 6- 72° 10` | 6- 72° 10` | 6- 72° 10` |
| 7- Hold 11° | 7- Hold 11° | 7- Hold 11° |
| Mo 07 | Mo 09 | |
| 1- T= 94° 5` | 1- T= 94° 5` | |
| 2- T= 94° 45`` | 2- T= 94° 45`` | |
| 3- T= 58° 45`` | 3- T= 59° 45`` | |
| 4- T=72 ° 45`` | 4- T=72 ° 45`` | |
| 5- Go to 2 REP 34 | 5- Go to 2 REP 29 | |
| 6- 72° 10` | 6- 72° 10` | |
| 7- Hold 11° | 7- Hold 11° | |

Los fragmentos amplificados de SSR fueron analizados mediante electroforesis capilar a través de un secuenciador automático ABI Prism 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystem) en INTA Castelar.

El genotipado de los individuos se realizó mediante el software GeneMapper versión 3.7 (Applied Biosystems). En primer lugar se realizó la observación de los patrones de bandas obtenidos para cada SSR. Se determinó el número total de bandas producidas y luego se registró la presencia / ausencia de las mismas para cada clon

como 1 ó 0, respectivamente. Con esta información se construyó una matriz de datos binarios en la cual cada fila representó un material y cada columna una banda de SSR.

El análisis estadístico se realizó con el programa NTSyS pc (Rohlf, 1998). Para determinar la similitud genética entre los clones se aplicó el coeficiente de Dice (1945) y la matriz de similitud se sometió a una clasificación (clúster) por el método de ligamiento promedio (UPGMA). Para la visualización del agrupamiento fue construido un dendrograma.

Análisis de la Isoenzima Alcohol Deshidrogenasa (ADH)

También se realizó el análisis de la isoenzima Alcohol deshidrogenasa (ADH) de las semillas cosechadas del árbol plus del rodal semillero de la localidad de Vera del Norte Santafesino, siendo este material genético medio hermano de las plantas madres del minijardín clonal.

El análisis isoenzimático se realizó a partir de la maceración de semillas germinadas en cajas de Petri. Las semillas se molieron con la ayuda de una varilla de vidrio, y luego se homogeneizó el material agregándole 0,4 ml de buffer (Tris/HCL pH 7.5).

El medio de soporte utilizado fue gel de almidón al 11 %. Se efectuó electroforesis horizontal en cámara de frío a 4 ° C (Verga, 2001).

El contacto entre los geles y el buffer de las cubas se estableció a través de un paño que actuó a modo de puente entre electrodo y los extremos del gel (Verga, 1995, 2001).

El potencial eléctrico que se aplicó fue de 160 mA y la corrida fue de aproximadamente 4 h.

Una vez finalizada la corrida electroforética, se procedió a dividir el gel de almidón en dos capas horizontales para someterlas cada una a una técnica de tinción específica.

Las soluciones utilizadas de Buffers de electrodo I y II, para realizar el análisis de isoenzimas se detallan en las Tablas 4.4 y 4.5.

Tabla 4.4.- Buffers de electrodo I: Tris/Ácido cítrico pH 7.0.

| Agua destilada (l) | TRIS (g) | Ácido Cítrico (g) |
|--------------------|----------|-------------------|
| 3 | 49,2 | 27 |
| 5 | 82,0 | 45 |

Observación: Diluir el Tris en agua destilada. Titular con el ácido cítrico hasta pH 7.0. Completar con agua destilada hasta el volumen final.

Tabla 4.5.- Buffers de electrodo II: Poulik. Ac. Bórico / Na(OH) pH 8.2

| Agua destilada (l) | Ácido Bórico (g) | NaOH (g) |
|--------------------|------------------|----------|
| 3 | 55.5 | 7.2 |
| 5 | 92.5 | 12.0 |

Diluir el ácido bórico en agua destilada. Titular con el NaOH hasta pH 8.2. Completar con agua destilada hasta el volumen final.

Los Buffers para la preparación de los geles de almidón se detallan en las tablas 4.6 y 4.7.

Tabla 4.6.- Buffer III. Tris/Ácido cítrico pH 7.0 dilución 1:5

| Diluir el Buffer de electrodo TRIS pH 7.0 en la proporción 1:5 | |
|---|----------------------------|
| 200 ml Buffer electrodo TRIS pH 7.0 | 1.000 ml de agua destilada |
| 600 ml de Buffer de electrodo TRIS pH 7.0 | 3.000 ml de agua destilada |
| 1.000 ml de Buffer de electrodo TRIS pH 7.0 | 5.000 ml de agua destilada |

Tabla 4.7.- Buffer IV. Tris/Ácido cítrico pH 8.7

| Agua destilada (l) | TRIS (g) | Ácido Cítrico (g) |
|--------------------|----------|-------------------|
| 3 | 27.6 | 4.8 |
| 5 | 46.2 | 8.0 |

Diluir el Tris en agua destilada. Titular con el ácido cítrico hasta pH 8.7. Completar con agua destilada hasta el volumen final.

Fueron utilizados para las soluciones colorantes los Buffers: **Buffer V**: Tris/HCl pH 8.0: Tris 0.05M llevar a pH 8.0 con HCl y **Buffer VI**: Tris/HCl pH 7.5 Tris 0.05M llevar a pH 7.5 con HCl.

Las soluciones colorantes utilizadas fueron **ADH** Alcohol deshidrogenasa E.C. 1.1.1.1; 150 ml Tris/HCl pH 8.0; 37,55 mg MTT ; 37,5 mg NAD ; 5 ml PMS 1% ; 30 ml Etanol.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de clones de *Prosopis alba* mediante microsatélites

Se observó un 82% de amplificación con los primers evaluados, resultando que los primers que mejores funcionaron para los genotipos evaluados fueron el Mo 08, Mo 09, Mo 13 y el Mo 05.

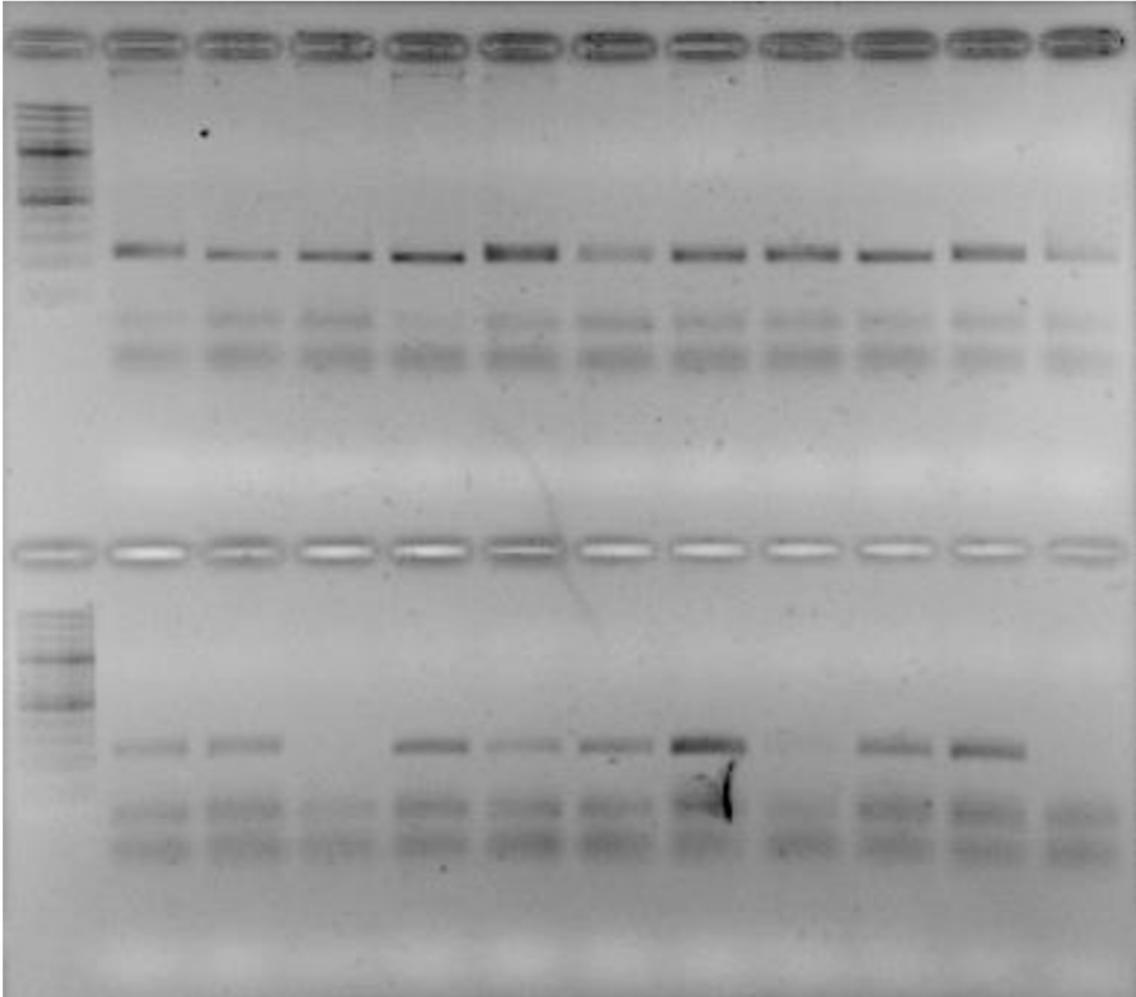


Figura 4.1.- Imágenes del revelado del gel amplificado por PCR de clones de *Prosopis alba* con el primer Mo09 con 86,4 % de los genotipos amplificados en este gel.

Tabla 4.8.- Matriz construida en base de los resultados originados de los análisis de microsatélites. Grupo 1: clones que presentaron mayor capacidad de enraizamiento en los ensayos de viabilidad de la técnica de miniestacas.

| Clones | Grupos | Mo08 | | Mo13 | | Mo05 | | Mo09 | | Mo07 | |
|---------------|---------------|-------------|-----|-------------|-----|-------------|-----|-------------|-----|-------------|-----|
| J17 | 1 | 0 | 0 | 232 | 238 | 217 | 217 | 209 | 209 | 191 | 191 |
| J20 | 1 | 0 | 0 | 227 | 239 | 0 | 0 | 209 | 209 | 0 | 0 |
| J22 | 1 | 219 | 219 | 227 | 239 | 217 | 217 | 209 | 209 | 206 | 212 |
| J26 | 1 | 217 | 217 | 238 | 240 | 217 | 217 | 209 | 209 | 191 | 191 |
| J46 | 1 | 217 | 217 | 227 | 238 | 0 | 0 | 209 | 209 | 0 | 0 |
| J55 | 1 | 219 | 219 | 227 | 239 | 217 | 217 | 209 | 209 | 193 | 193 |
| J63 | 1 | 217 | 217 | 238 | 240 | 0 | 0 | 209 | 209 | 0 | 0 |
| J72 | 1 | 217 | 217 | 227 | 238 | 0 | 0 | 209 | 209 | 0 | 0 |
| J73 | 1 | 217 | 217 | 227 | 239 | 0 | 0 | 209 | 209 | 0 | 0 |
| J79 | 1 | 217 | 217 | 227 | 239 | 219 | 219 | 209 | 209 | 191 | 191 |
| J23 | 2 | 217 | 217 | 239 | 241 | 217 | 217 | 209 | 209 | 193 | 193 |
| J24 | 2 | 217 | 217 | 238 | 240 | 217 | 217 | 0 | 0 | 191 | 193 |
| J30 | 2 | 215 | 217 | 227 | 227 | 217 | 217 | 209 | 209 | 191 | 191 |
| J32 | 2 | 217 | 217 | 0 | 0 | 217 | 217 | 209 | 209 | 193 | 193 |
| J43 | 2 | 217 | 217 | 227 | 239 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| J44 | 2 | 215 | 219 | 239 | 239 | 221 | 221 | 209 | 209 | 191 | 191 |
| J99 | 2 | 217 | 217 | 228 | 239 | 217 | 217 | 0 | 0 | 191 | 191 |

En el dendrograma (Fig. 4.2.) se puede visualizar el agrupamiento determinando la similitud genética entre los clones evaluados en este trabajo. Se puede observar también la similitud de los clones que presentaron mayores tasas de enraizamiento independiente de las concentraciones de ácido indolbutírico (IBA), utilizados en los ensayos de enraizamiento. Se observa que los genotipos que presentan mayor capacidad de enraizamiento no presentan una similitud específica entre sí. Dentro de un grupo puede haber o no la presencia de genotipos de mayor capacidad de enraizamiento, sin respetar un patrón específico.

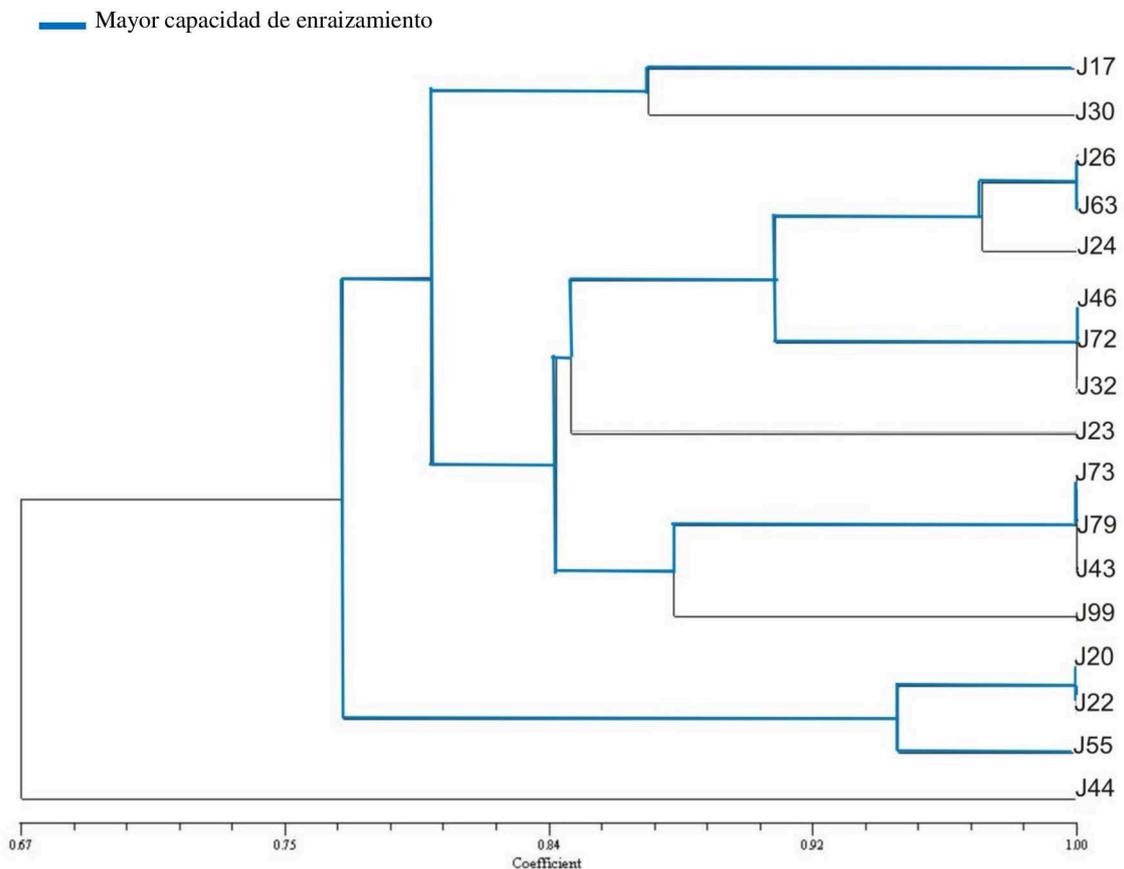


Figura 4.2.- Dendrograma obtenido por análisis clúster (UPGMA), basado en el coeficiente de similitud genética de DICE. Se resaltan valores de bootstrap mayores a 67%. Carácter: Capacidad de enraizamiento.

Nuevas investigaciones con base en estos datos podrían ser realizados para comparar las similitudes genéticas considerando otros caracteres y también con otros genotipos y con algarrobos de zonas diferentes a los de la cuña boscosa santafesina, entre otras comparaciones.

Análisis de la Isoenzima Alcohol Deshidrogenasa (ADH)

El control genético para esta enzima coincidió con las observaciones efectuadas en los zimogramas analizados (Verga, Com. Pers.).

La estructura de la enzima es dimérica codificada por dos loci, uno de ellos monomórfico y común a todas las especies y otro locus con tres variantes alélicas.

Se observó que el material genético analizado corresponde a un algarrobo blanco puro, o sea, no ha sufrido hibridaciones con otras especies de género. Al respecto resulta importante destacar que el algarrobo blanco es él de más difícil enraizamiento dentro del género y esto refuerza el éxito logrado con la técnica de miniestacas en los clones de algarrobo blanco trabajados en esta tesis.

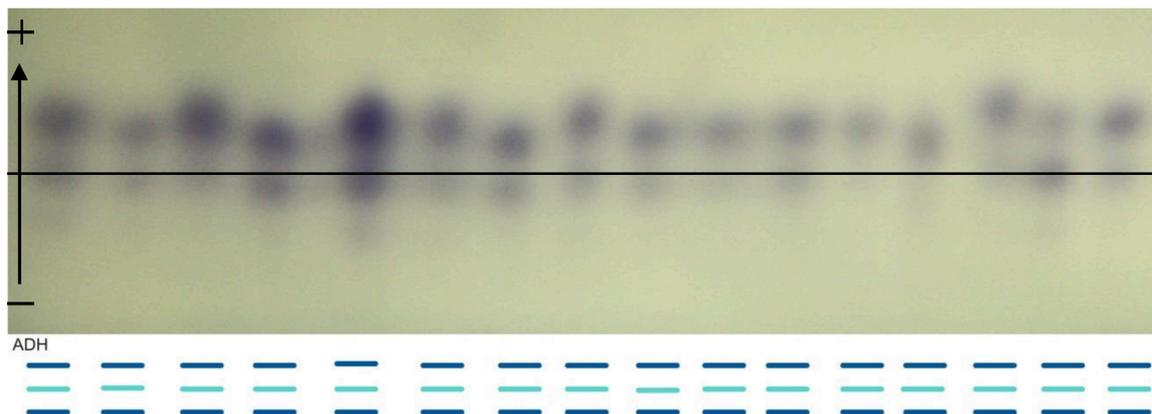


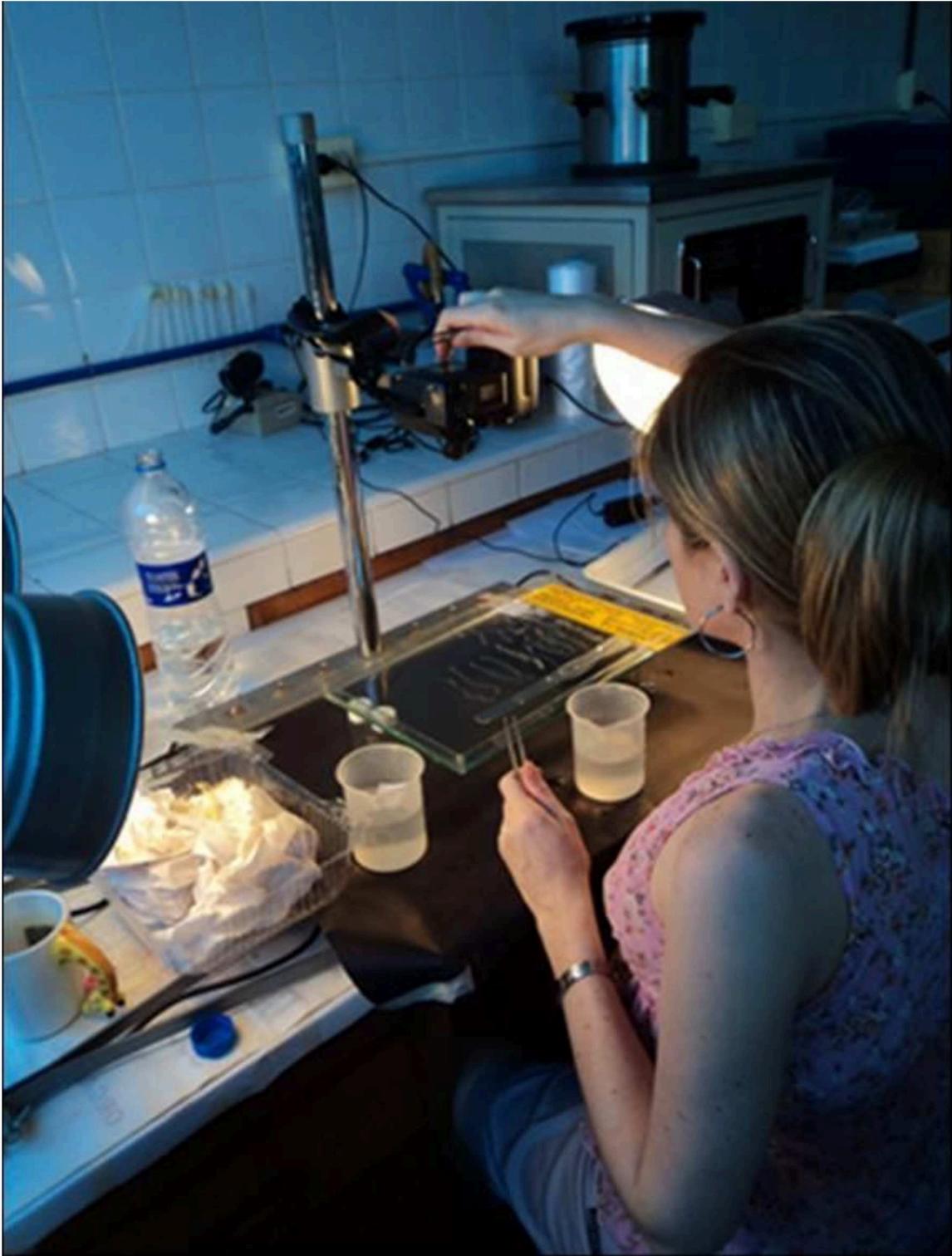
Figura 4.3.- Revelado del gel Zimograma de los loci ADH y representación esquemática de los fenotipos observados en el zimograma.

Se observa *Prosopis alba* homocigota. No se ha observado individuos heterocigotas. Lo que comprueba que el material clonado no posee hibridación con *Prosopis nigra* (comúnmente encontrado en el mismo lugar de origen de los árboles plus).

IV. CONCLUSIONES

Fue realizada la identificación genotípica del material clonado. Fue posible realizar la diferenciación de todos los clones evaluados. Nuevas investigaciones pueden ser realizadas en base a los resultados obtenidos en este trabajo. El trabajo concluye que el material clonado es *Prosopis alba* puro y no híbrido interespecífico con otras especies del género común en la región de origen (cuña boscosa santafesina). El trabajo también constituye el protocolo y base para la caracterización de futuros materiales clonados de la especie.

DISCUSIÓN GENERAL



La clonación de familias de *P. alba* a través de la técnica de miniestacas es viable. Lo mismo fue observado para otras especies forestales nativas y exóticas (Wendling y col., 2000; Xavier y col., 2003a, 2013; Alcantara y col., 2007; Almeida y col., 2007; Goulart y col., 2008; Andrejow y Higa, 2009; Souza y col., 2009; Brondani, y col., 2010, 2014a, b; Borges y col., 2011).

Actualmente en Latinoamérica varias empresas vienen utilizando esta técnica de clonación en la producción comercial de plantines de *Pinus* spp. y *Eucalyptus* spp. (Campinhos y col., 2000; Alcantara y col., 2007; Andrejow y Higa, 2009; Xavier y col., 2013).

Lo que muestra que las empresas pueden empezar a utilizar la técnica y protocolo de clonación desarrollados en este trabajo para la producción comercial de plantines de algarrobo blanco. Cabe aclarar que son necesarios ajustes para los genotipos específicos a clonar y para las condiciones ambientales del sitio de producción de los mismos.

Fue encontrada una concentración óptima para la aplicación de IBA para lograr un mejor desarrollo y crecimiento de los plantines clonales. Estos resultados están de acuerdo a lo encontrado en los trabajos de Goulart y col. (2008), Brondani y col. (2010, 2014a) y Borges y col. (2011) en el enraizamiento de miniestacas de híbridos de *Eucalyptus globulus*.

La época del año afectó en el enraizamiento de miniestacas de *P. alba*, presentando primavera las condiciones óptimas para el enraizamiento de las mismas. Varios autores refieren a este como uno de los factores que influyen en el enraizamiento de especies leñosas (Alcantara y col., 2007; Cunha y col., 2009; Hartmann y col., 2011; Xavier y col., 2013).

Desde el punto de vista científico, los resultados de este trabajo contribuirán a una mejor comprensión de los procesos anatómicos que controlan la rizogénesis adventicia de la especie. La etiolación relacionada con el grado de lignificación y la discontinuidad del anillo de fibras esclerenquimáticas afectó el enraizamiento de estacas y miniestacas. Cuanto menor es el grado de lignificación y mayor resulta la

discontinuidad (obtenidos por técnicas de etiolación), mayor es las tasas de enraizamiento. Materiales que presentaron mayor grado de lignificación y no presentaron discontinuidad en el anillo esclerequimático no enraizaron. Resultados similares fueron encontrados por Caro y col. (2002) en la micropropagación de *Prosopis chilensis*.

Resulta fundamental dirigir los esfuerzos en obtener tecnologías de propagación y mejoramiento de *Prosopis alba* para aumentar el desarrollo y domesticación de esta leñosa de importancia económica, social y ambiental. Ello posibilitaría aumentar la sustentabilidad de los sistemas productivos y la recuperación de áreas degradadas con el fin de revertir el agotamiento del recurso, posibilitando reponer plantales y establecer reservas genéticas.

Nuevas investigaciones deberían ser realizadas para optimizar la aplicación de la técnica con diferentes metodologías como por ejemplo las de minijardín clonal, así como para otros genotipos y condiciones específicas. Sería interesante también poder evaluar otros factores que pueden influir en enraizamiento de miniestacas de la especie.

Se propone también que en futuros trabajos se pueda evaluar la viabilidad operacional y económica de la aplicación de esta técnica de propagación para esta especie en la región.

Destacase también la importancia de experimentar la aplicación de la técnica con plantas madres originadas de micropropagación (microestacas).

CONCLUSIONES GENERALES



Se logró con éxito la clonación monoclonal por la técnica de miniestacas en *P. alba*, obteniendo un 99,6% de enraizamiento en los 55 genotipos evaluados bajo las condiciones de rejuvenecimiento y etiolación utilizadas.

No se observó influencia de las concentraciones de IBA en porcentajes de enraizamiento, sin embargo, se observó influencia de las concentraciones de IBA en altura, peso de la materia fresca, número de hojas y foliólulos, longitud de pecíolo y longitud, número y peso fresco de raíces.

No se observaron variaciones anatómicas relacionadas con las diferentes concentraciones de IBA utilizadas.

Altas correlaciones entre las características de las plantas madre y de los brotes rejuvenecidos utilizados fueron observadas, destacándose que los factores correlacionados con los mismos influenciaron en la velocidad y uniformidad del enraizamiento de los clones evaluados.

Se encontraron variaciones entre clones de *P. alba*; es por ello que se sugiere que la técnica debería ser ajustada para cada clon para lograr un índice satisfactorio en el enraizamiento.

La época del año influye en enraizamiento de miniestacas de algarrobo blanco.

Puede afirmarse que en las miniestacas de *Prosopis alba*: (1) el anillo de esclerénquima compuesto está formado por dos regiones principales: los casquetes de esclerénquima y las regiones entre casquetes; (2) en las regiones entre casquete se observan áreas de variable grado de lignificación y, a veces regiones con células no lignificadas; (3) estas regiones se presentan en la periferia de los radios floemáticos; (4) cuando estas regiones están poco o no lignificadas representan discontinuidades en el anillo de esclerénquima que facilitan el avance hacia la periferia de los primordios radicales; (5) miniestacas con mayor grado de juvenilidad y crecidas en condiciones de etiolación presentaron menor grado de lignificación y lograron mayores porcentajes de enraizamiento, generando plantines clonales. Lo mencionado anteriormente permite concluir que el grado de lignificación del eje utilizado como propágulo influyó sobre el grado de enraizamiento logrado.

Fue posible realizar la caracterización genética del material clonado mediante los protocolos utilizados. La caracterización genética mostró que los genotipos enraizados son de *Prosopis alba* puros, sin cruzamiento con otras especies del género.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- Abedini, W. (2005) Propagación vegetativa de *Parkinsonia aculeata* L. por estaquillado. *Rev Cienc For Quebracho* 12: 23 – 33.
- ABRACAVE (Associação Brasileira de Florestas Renováveis) (2001) Anuário Estatístico. ABRACAVE, Belo Horizonte, Brasil, 235 p.
- ABRAF (Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas) (2013). Anuário estatístico ABRAF (2013) ano base 2012. ABRAF, Brasília, Brasil, 148 p.
- AFOA (Asociación Forestal Argentina) (2012). Bosque de Cultivo. Disponible en http://www.foa.org.ar/bosques_en_argentina_detalle.php?p=41. Acceso 17 julio 2012.
- Ahkami, A.H.; Lischewski, S.; Haensch, K.T.; Porfirova, S.; Hofmann, J.; Rolletschek, H.; Melzer, M.; Franken, P.; Hause, B.; Drueg, U. y Hajirezaei, M.R. (2009) Molecular physiology of adventitious root formation in *Petunia hybrida* cutting: involvement of wound response and primary metabolism. *New Phytol* 181: 613 – 625.
- Alcantara, G.; Ribas, L.; Higa, A.; Zuffellato Ribas, K. y Koehler, H. (2007) Efeito da idade da muda e da estação do ano no enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. *Rev Arvore*. 3: 399 – 404.
- Alfenas, A.C.; Zauza, E.A.V.; Mafía, R.G. y Assis, T.F. (2004) Clonagem e doenças do eucalipto. UFV, Viçosa, Brasil, 442 p.
- Alfenas, A.C.; Zauza, E.A.V.; Máfia, R.G. y Assis T.F. (2009) Clonagem e doenças do eucalipto. UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 500 p.
- Almeida, F. 2006. Propagação vegetativa de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. por estaquia e miniestaquia. *Rev Arvore* 3: 445 – 453.

- Almeida, F.; Xavier, A.; Moreira Dias, J. y Nogueira Paiva, H. (2007) Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. *Rev Arvore* 3: 455 – 463.
- Almeida, E.; Scalopi, E.; Jesus, N. y Martins, A. (2008) Propagação de jambeiro vermelho (*Syzygium malaccense* L.) por estaquia de ramos herbáceos. *Biosci J* 1: 39 – 45.
- Altamura, M.M. (1996) Root histogénesis in herbaceous and woody explants cultures in vitro: A critical review. *Agronomie* 16: 589 – 602.
- Althaus, M.; Leal, L.; Silveira, F.; Zuffellato-Ribas, K. y Fortes Ribas, L. (2007) Influência do ácido naftaleno acético e dois tipos de substrato no enraizamento de estacas de jasmim-amarelo. *Rev Cien Agron* 3: 322 – 326.
- Amissah, N. y Bassuk, N. (2007) Effect of Light and Cutting Age on Rooting in *Quercus bicolor*, *Quercus robur* and *Quercus macrocarpa* Cuttings. *Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society* 57: 286 – 292.
- Amissah, N.; Paolillo, D.J. Jr. y Bassuk, N. (2008) Adventitious root formation in stem curtting of *Quercus bicolor* and *Quercus macrocarpa* and its relationship to stem anatomy. *J Amer Soc Hort Sci* 133: 479 – 486.
- Andrejow, G.M.P. (2006) *Minijardim Clonal de Pinus taeda* L. *Disertación* (Tesis Maestría en Ingeniera Forestal), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 92 p.
- Andrejow, G.M.P. y Higa, A.R. (2009) Potencial de enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. provenientes de brotação apical de mudas jovens. *Floresta* 39: 897 – 903.

- Angeloni, P.N.; Mroginski, L.A.; Rey, H.Y.; Flachsland, E.A. e Inda, M.C. (1992) Establecimiento in vitro de especies de los géneros *Gleditsia*, *Prosopis*, *Toona* y *Cedrela*. *FACENA* 9: 135 – 150.
- Arce, J.P.; Medina, M.C.; Balboa, O. (1990) Effect of salinity on germination of three *Prosopis* species (*P. alba*, *P. chilensis* and *P. tamarugo*). *Cienc Invest Agraria* 17: 71 – 75
- Arce, J.P. y Balboa, O. (1991) Seasonality on rooting of *Prosopis chilensis* cuttings and in vitro micropropagation. *Forest Ecol Manag* 40: 163 – 173.
- Arce, J.P. y Medina, M.C. (1997) Micropropagation of *Prosopis* species (mesquites). In: Bajaj, Y.P.S. (ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 39: 367 – 380.
- Assis T.F. (2001) Evolution of technology for cloning *Eucalyptus* in large scale. In: Simposio Internacional IUFRO. Valdivia. Anales. 16 p. (CD-Rom).
- Assis T.F. y Mafia R.G. (2007) Hibridação e clonagem. In: Borém, A. (ed.) *Biocologia Florestal*. Viçosa, p.93 – 121.
- Assis, T.F.; Fett-Neto, A.G. y Alfenas, A.C. (2004) Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwood with emphasis on *Eucalyptus*. In: *Plantation forest biotechnology for the 21st century* (Eds.: Walter, C. y Carson, M.) *Research Sign Post*, Nueva Delhi, India, p. 303 – 333.
- Azcón Bieto, J. y Talón, M. (2000) *Fundamentos de fisiología vegetal*. Mcgraw – Hill, España, 651 p.
- Baccarin, F.J.B. (2012) *Métodos para regaste, conservação e multiplicação em larga escala de matrizes de Eucalyptus benthamii Maiden & Cambage*. *Disertación (Tesis Maestría) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, Brasil, 77 p.*

- Balboa, O.; Parraguez, J. y Arce, J.P. (1990) Phenology studies of *Prosopis* species growing in Chile. In: Habit, M. y Saavedra, J. (eds). The current state of knowledge on *Prosopis juliflora* FAO, Rome. 259 – 267.
- Bassuk, N.; Myske, D. y Maynard, B. (1985) Stok plant etiolation for improved rooting of cuttings. *Proceedings International Plant Propagators Society* 35: 543 – 550.
- Bastos, D. y Scarpate Filho, J.A.; Tomaz, M.L.; Rodriguez, A.P.M. y Fatinansi, J.C. (2005) Aspectos anatômicos e histológicos do enraizamento de estacas de caramboleira (*Averrhoa carambola* L.). *Actas Port Horticultura* 2: 55 – 61.
- Beakbane, A.B. (1961) Structure of the plant stem in relation to adventitious rooting. *Nature* 192: 954 – 955.
- Bennett, T. y Scheres, B. (2010) Root development-two meristems for the price of one? *Current Topics. Dev Biol* 91: 67 – 102.
- Bessegga, C.F.; Pometti, C.L.; Miller, J.T.; Watts, R; Saidman, B.O. y Vilardi J.C. (2013) New microsatellite loci for *Prosopis alba* and *P. chilensis* (Fabaceae) *Appl Plant Sci.* May 1 (5): DOI: 10.3732/apps.1200324.
- Biasi, L.A. (1996) Emprego do estiolamento na propagação de plantas. *Cienc Rural* 26: 309 – 315.
- Biasi, L.A.; Carvalho D. C. de; Wolf G. D.; Zanette F. (2002) Potencial organogénico de tecidos caulinares e radiculares de caquizeiro. *Rev Bras Frut* 24 (1): 29 – 34.
- Borges, S.R.; Xavier, A.; Oliveira, L.S.; Melo, L.A. y Rosado, A.M. (2011) Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. *Rev Arvore* 35: 425 – 434.

- Bortolini, M.; Lima, D.; Alcantara, G.; Fanti, G.; Biasi, L.; Quoirin, M.; Koehler, H. y Zuffellato-Ribas, K.C. (2008) Enraizamento de estacas de *Ficus benjamina* L. *Scientia Agr* 4: 539 – 543.
- Brondani, G.E. (2008) Miniestaquia e micropropagação de *Eucalyptus bentahmii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. Disertación. (Maestría en Ingeniería Forestal). UFP. Curitiba. 118 p.
- Brondani, G.E. (2012) Aspectos morfofisiológicos na clonagem de *Eucalyptus bentahmii*. Disertación (Tesis Doctoral). ESALQ. Piracicaba. 184 p.
- Brondani, G.E.; Grossi, F.; Wendling, I.; Dutra, L.F. y Araujo, M.A. (2010) Aplicação de IBA para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Acta Sci-Agron* 32: 667 – 674.
- Brondani, G.E.; Baccarin, F.J.B.; Bergonci, T.; Gonçalves, A.N. y Almeida, M. de (2014a) Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii*: efeito do genótipo, AIB, zinco, boro e coletas de brotações. *Cerne* 20: 147 – 156.
- Brondani, G.E.; Baccarin, F.J.B.; Gonçalves, A.N. y Almeida, M. de. (2014b) Nutritional content in *Eucalyptus benthamii* mini-stump leaves. *Acta Sci-Agron* 36 (4): 465 – 474.
- Brune, A. (1982) Estratégias da Multiplicação Vegetativa no Melhoramento Florestal. *Rev Arvore* 6: 162 – 165.
- Burkart, A. (1943) Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. AcmeAgency, Buenos Aires. Argentina, 590 p.
- Burkart A. (1976) A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae) (Part 1 and 2). Catalogue of the recognized species of *Prosopis*. *J Arnold Arboretum* 57: 219 – 249 y 450 – 525.

- Cabrera A. 1976. Regiones Fitoreográficas Argentinas. In: Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo II. ACME. Fascículo 1, 85 p.
- Campinhos, E.N.; Iannelli, C.M.; Cardoso, N.G.; Almeida, M.A. y Rosa, A.C. (2000) Hidrojardim Clonal Champion: uma otimização na produção de mudas de eucalipto. *Rev Silvicultura* 80: 42 – 46.
- Caro, L.A.; Polci, P.A.; Lindström, L.I.; Echenique, C.V. y Hernández, L.F. (2002) Micropropagation of *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz from young and mature plants. *Biocell* 26: 25 – 33.
- Carranza, C. y Ledesma, M. (2005). Sistemas Silvopastoriles en el Chaco Árido. *Revista de Información sobre Investigación y Desarrollo Agropecuario Forestales IDIA XXI INTA* (8): 240 – 246.
- Castillo de Meier, G.C. y Bovo, O.A. (2000) Plant regeneration from single nodal-stem explants of legume tree *Prosopis alba* (Griseb). *Biocell* 24: 89 – 95.
- Castillo De Meier, G. y Barceló Muñoz, A. (2002) Medio sólido/líquido en el cultivo in-vitro de segmentos uninodales de *Prosopis alba*. *Actas Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, SGCYT, UNNE. FCA-UNNE, Corrientes, Argentina.*
- Castillo De Meier, G. y Vega, M.V. (2006) Micropropagación in vitro de Algarrobo Blanco. *Actas Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, SGCYT, UNNE. FCA-UNNE, Corrientes, Argentina.*
- Chaves, L.L.B.; Carneiro, J.G.A. y Barroso, D.G. (2006) Crescimento de mudas de angico vermelho produzidas em substrato fertilizado, constituído de resíduos agro-industriais. *Sci For* 72: 49 – 56.

- Coronel de Renolfi, M.; Díaz, F.; Cardona1, G. y Ruiz, A.P. (2012) Tiempos, rendimientos y costos del aserrado de Algarrobo Blanco (*Prosopis alba*) en Santiago del Estero, Argentina. *Rev Cienc For Quebracho* 20: 15 – 28.
- Corrêa, L.R. y Fett-Neto, A.G. (2004) Effects of temperature on adventitious root development in microcuttings of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. *J Therm Biol* 29: 315 – 324.
- Coruzzi, G.M. y Zhou, L. (2001) Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging “*matrix effects*”. *Current Opinion. Plant Biol* 4: 247 – 253.
- Cosiansi, J.F.; Hayipanteli, S.; Irico, A. y Da Riva, D.P. (1998) Maquina de trillar frutos de *Prosopis* spp. En: *Engeneria y Mecanización Rural en el ámbito Latinoamericano*. UNLP, Buenos Aires, Argentina, p. 280 – 286.
- Cuisance, P. (1988) *La multiplicación de las plantas y el vivero*. Mundi Prensa, 165 p.
- Cunha, A.C.M.C.M. da; Wendling, I. y Souza Júnior, L. (2004) Influência da Concentração do Regulador de Crescimento para Enraizamento AIB na Formação de Mudas de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax por Estaquia. *Bol. Pesq. Fl.* 49: 17 – 29.
- Cunha, A.C.M.C.M. da; Paiva, H.N. de; Leite, H.G.; Barros, N.F. de y Leite, F.P. (2009) Relações entre variáveis climáticas com produção e enraizamento de miniestacas de eucalipto. *Rev Arvore* 33: 195 – 203.
- Dayanandan S.; Rajora O.P. y Bawa K.S. (1998) Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Theor App Genet* 96: 950 – 956.
- D’Ambrogio de Argüeso, A. (1986) *Manual de técnicas en histología vegetal*. Facultad de Agronomía-UBA, Ed. Hemisferio Sur, Buenos aires, Argentina, 83 p.

- Daniel, T.W.; Helms, J.A. y Backer, F.S. (1982) Principios de silvicultura. Mcgraw-Hill, México, 492 p.
- Davies Junior, F.T. y Hartmann, H.T. (1988) The physiological basis of adventitious root formation. *Acta Horti* 227: 113 – 120.
- Davies Junior, F.T.; Lazarte, J.E. y Joiner, J.N. (1982) Initiation and Development of Roots in Juvenile and Mature Leaf Bud Cuttings of *Ficus-Pumila*. *Am J Bot* 69: 804 – 811.
- De Ataíde, M.S. (1990) Taxonomy and distribution of the genus *Prosopis* L. In: Hahit, M. y Saavedra, J. (eds). The current state of knowledge on *Prosopis juliflora* FAO: 117 – 185
- De Melo Araujo S. (1977) Especies arbóreas y arbustivas para las zonas áridas y semiáridas de América Latina. Serie: Zonas Áridas y Semiáridas n.12. Programa conjunto FAO/ PNUMA de Control de la Desertificación en América Latina y el Caribe. 347 p.
- Deschamps, C. (1993) *Propagação Vegetativa “in vivo” e “in vitro” de Sarandi* (*Sebastiania schottiana* Muell. Arg.), Espécie Florestal de Mata Ciliar. Disertación (Tesis Maestría en Agronomía – Fisiología Vegetal), Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil, 128 p.
- De Klerk, G. (2002) Rooting of microcutting: Theory and practice. *In Vitro Cell Dev-Pl* 38: 415 – 422.
- De Souza, S.M. y Nascimento, C.E. (1984) Propagação vegetativa de algaroba por estaquia. *EMBRAPA/ CPATSA Petrolina* 27:3.

- De Souza, S.M. y Felker, P. (1986) The influence of stock plant fertilization on tissue concentrations of N, P and carbohydrates and the rooting of *Prosopis alba* cuttings. *Forest Ecol Manag* 16: 181 – 190.
- Dias, P.C.; Xavier, A.; Oliveira, M.L. de; Paiva, H.N. y Correia A.C.G. (2012) Propagação Vegetativa de progênies de meios-irmãos de Angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan) por miniestaquia. *Rev Arvore* 36 (3): 389 – 399.
- Dice, L. R. (1945) Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297 – 302.
- Dirección de Forestación – Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca de la Nación, 2008. Disponible en: <http://www.minagri.gob.ar/new/0-0/forestacion/>
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M. y Robledo, C.W. (2010) InfoStat. Release 2010. FCA - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Doll, U.; Vogel, H.; Jeldres, P. y Muñoz, M. (2003) Estudios de propagación vegetativa en Matico (*Buddleja globosa*). *Rev Cienc Invest Agr* 30: 211 – 216.
- Doud, S.L. y Carlson, R.F. (1977) Effects of etiolation, stem anatomy, and starch resources on root initiation of layered *Malus* clones. *J Amer Soc Hort Sci* 102: 487 – 491.
- Drake, F.; Acuna, E. y Salas, S. (2003) Evaluación retrospectiva para determinar la oportunidad de raleo en un rodal de pino oregón de 24 años. *Bosque* 24 (2): 85 – 91.
- Druegge, U.; Kadner, R.; Rapaka, V.K. y Zerche, S. (2008) The role of carbohydrates in adventitious root formation within the global propagation chain: what does

make difference? V International Symposium on Adventitious Root Formation. Alcalá de Henares, Madrid, Spain, 45 p.

Duarte, M. Del R. y Wolf, S. (2005) Anatomical characters of the phyllode and stem of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don (Fabaceae). *Rev Bras Farmacogn* 15: 71 – 76.

Duarte, O.; Fachinello, J. y Dos Santos Filho, B. (1992) Multiplicação da Goiabeira serrana através de estacas semilenhosas. *Pesq Agropec Bras* 27: 513 – 516.

Edwards, R.A. y Thomas, M.B. (1980) Observations on physical barriers to root formation in cuttings. *Plant Prop.* 26: 6 – 8.

Elbasheer, Y.H. y Elkalifa, A.W. (2010) Anatomy of stem cuttings in relation to adventitious rooting of some forest trees. *University Africa J Sci* 1: 62 – 76.

Esau, K. (1965) *Vascular differentiation in Plants*. Holt, Rinehart and Winston Inc., New York, Estados Unidos de Norteamérica, 160 p.

Esau, K. (1977) *Anatomy of seed plants*. 2ª ed. John, Wiley y Sons, New York, Estados Unidos de Norteamérica, 576 p.

Evert, R.F. (2006) *Esau's Plant Anatomy*. Wiley-Interscience, New Jersey, Estados Unidos de Norteamérica, 601 p.

Ewens, M. y Felker, P. (2003) The potential of mini-grafting for large scale commercial production of *Prosopis alba* clones. *J Arid Environ* 55: 379 – 387.

Ewens, M. y Navall, M. (2006) Principales conclusiones de proyectos de investigación en Silvicultura del Algarrobo Blanco (*Prosopis alba*) en el Campo Experimental Fernández. 2º Jornadas Forestales de Santiago del Estero. Santiago del Estero, Argentina, junio de 2006.

- Ewens, M. y Felker, P. (2010) A Comparison of pod production and insect ratings of 12 elite *Prosopis alba* clones in a 5-year semi-arid Argentine field trial. *Forest Ecol Manag* 260: 378 – 383.
- Ewens, M.; Gezan, S. y Felker, P. (2012) Five Year Field Evaluation of *Prosopis alba* Clones on pH 9–10 Soils in Argentina Selected for Growth in the Greenhouse at *Seawater Salinities (45 dS m⁻¹)*. *Forests* 3: 95 – 113.
- Felker, P. (2008) A light-intensity controlled, mist system with water and power backup for rooting cuttings of agroforestry species. *Agroforest Syst* 72: 23 – 26.
- Felker, P. (2009) Unusual physiological properties of the arid adapted tree legume *Prosopis* and their applications in developing countries. En: *Perspectives in Biophysical Plant Ecophysiology: A Tribute Park S. Nobel*. (Ed.: De la Barrera, E.), Universidad Nacional Autónoma de México, México, 221 – 255.
- Felker, P. y Clark, P.R. (1981) Rooting on mesquite (*Prosopis*) cuttings. *J Range Manage* 34: 466 – 468.
- Felker, P. y Guevara, J.C. (2003) Potential of commercial hardwood forestry plantations in arid lands — an economic analyses of *Prosopis* lumber production in Argentina and the United States. *Forest Ecol Manag* 186: 271 – 286.
- Felker, P.; Anderson, P.; Perino, D. y Miller, D. (1994) Grading mesquite lumber. *Special Publ. of Center Semi-Arid Forest Resources, Texas A&M University Kingsville*.
- Felker, P.; López, C.; Soulier, C.; Ochoa, J.; Abdala, R. y Ewens, M. (2001). Genetic evaluation of *Prosopis alba* (Algarrobo) in Argentina for cloning elite trees. *Agroforest Syst* 53: 65 – 76.

- Felker, P.; Medina, D.; Soulier, C.; Velicce, G.; Velarde, M. y Gonzalez, C. (2005) A Survey of environmental and biological factors (*Azospirillum* spp, *Agrobacterium rhizogenes*, *Pseudomonas aurantiaca*) for their influence in rooting cuttings of *Prosopis alba* clones. *J Arid Environ* 61: 227 – 247.
- Felker, P.; Ewens, M.; Velarde, M. y Medina, D. (2008) Initial evaluation of *Prosopis alba* Griseb clones selected for growth at seawater salinities. *Arid Land Res Manag* 22: 334 – 345.
- Ferreira, E.M.; Alfenas, A.C.; Mafia, R.G.; Leite, H.G.; Sartorio, R.C. y Penchel Filho, R.M. (2004) Determinação do tempo ótimo do enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus* spp. *Rev Arvore* 28: 183 – 187.
- Ferreira, D.A.; Barroso, D.G.; Silva, M.P.S.; Souza, J.S.; Freitas, T.A.S. y Carneiro, J.G.A. (2012) Influência da posição das miniestacas na qualidade de mudas de cedro australiano e no seu desempenho inicial no pós-plantio. *Cienc Florest* 22: 715 – 723.
- Ferriani, A.; Bortolini, M.; Zuffellato-Ribas, K.C. y Koehler, H. (2006) Propagação vegetativa de estaquia de Azaléia arbórea (*Rhododendron Thomsonii* HOOK. f.). *Semina: Cienc Agr* 1: 35 – 42.
- Ferriani, A.P.; Borges, M.V.; Zuffellato-Ribas, K.C.; Carpanezi, A.A.; Koehler, H.S. (2007) Influência da época do ano e das diferentes formas de aplicação de ácido naftaleno acético (ANA) no enraizamento de *Mikania micrantha* Kunth. *Rev Bras Pl Med* 2: 102 – 107.
- Fett-Neto, A.G; Fett, J.P.; Veira Goulart, L.W.; Pasquali, G., Termignoni, R.R. y Ferreira, A.G. (2001) Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiol* 21: 457 – 464.

- Floriano, E.P. (2004) Produção de mudas florestais por via assexuada (Caderno Didático, n.3). ANORGS, Santa Rosa, Brasil, 37 p.
- Fochesato, M.L.; Martins, F.T.; Souza, P.V.D.; Schwarz, S.F. y Barros, I.B.I. (2006) Propagação de Louro (*Laurus nobilis* L.) por estacas semilenhosas com diferentes quantidades de folhas e tratadas com ácido indolbutírico. *Rev. Bras. Pl. Med.* 3: 72 – 77.
- Fonseca, C.E.L.; Sperândio, J.P.; Corrêa, M.P.F.; Bueno, D.M. y Lima, R. (1991) Propagação Vegetativa de Jacarandá-da-baía através da Estaquia. *Pesqui Agropecu Bras* 26: 31-37.
- Foster, G.S.; Stelzer, H.E. y Merae, J.B. (2000) Loblolly pine cutting morphological traits: effects on rooting and field performance. *New Forest* 19: 291 – 306.
- Freitas, T.A.S.; Barroso, D.G.; Souza, L.S.; Carneiro, J.G.A. y Paulino, G.M. (2010) Produção de mudas de eucalipto com substratos para sistema de blocos. *Rev Arvore* 34: 761 – 770.
- Furlan, R. A. (2002) Estaquia de Pinus: gênero segue a tendência mundial de florestas clonais. *Addubare, Piracicaba*, n. 5, 2002. 15 p. Obra no vista. Cita tomada de Andrejow, G.M.P. e Higa, A.R. (2009).
- Gahan, P.B. y George, E.F. (2008) Adventitious regeneration. En: *Plant Propagation by tissue culture. The background.* (Eds.: George, E.F.; Hall, M.A.; De Kerk, G.J.). Springer, Dordrecht, Países Bajos 335 – 401.
- Galera, F.M. (2000) *Los Algarrobos: Las Especies del Género Prosopis (Algarrobos) de América Latina con especial énfasis en aquellas de interés económico.* Córdoba, Argentina, 269 p.

- Garay, M.R.; Nosedá, P.A.; Guariniello, J.; Cortizo, S.; Mujica, G.; Lewi, D.M. y Ríos, R.D. (2009) Identificación de clones de álamo y sauce mediante microsatélites. Jornada de Salicaceas. Mendoza, Argentina 6 p.
- Gardner, F.E. (1929) The relationship between tree age and the rooting of cuttings. Proc Am Soc Hort Sci 26: 101 – 104.
- Geiss, G.; Guttierrez, L. y Bellini, C. (2009) Adventitious root formation: new insights and perspectives. Ann. Plant Reviews 37: 127 – 156.
- Giménez, A.; Ríos, N.; Moglia, G. y López, C. (1998) Leño y corteza de *Prosopis alba* Griseb., Algarrobo Blanco, en relación con algunas magnitudes dendrométricas. Bosque 19: 53 – 62.
- Gomes, A.L. (1987) Propagação clonal: princípios e particularidades. Univesidade de Trás-os-montes y Alto Douro, Vila Real, Portugal 69 p.
- Goulart, P.B.; Xavier, A. y Cardoso, N.Z. (2008) Efeito dos reguladores de crescimento AIB e ANA no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*. Rev Arvore 32: 1051 – 1058.
- Goulart, P.B. y Xavier, A. (2010) Influencia do modo de acondicionamento de minestacas no enraizamento de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Revista Arvore 33 (3): 407 – 415.
- Green, B.; Tabone, T. y Felker, P. (1990) A comparison of amide and ureide nitrogen sources in tissue culture of tree legume *Prosopis alba* clone B2Vso. Plant Cell Tiss Org 21: 83 – 86.
- Hackett, W.P. (1987) Donor plant maturation and adventitious root formation. En: Adventitious root formation in cuttings (Eds.: Davies, T.D.; Haissig, B.E. y Sankhla, N.) Dioscorides Press, Portland 11 – 28.

- Hamann, A. (1995) Effects of hedging on maturation in loblolly pine: rooting capacity and rootformation. *Disertación (Tesis Maestría en Ciencias)*, State University of New York, New York, Estados Unidos de Norteamérica.
- Handa, L.; Sampaio, P.T.B. y Quisen, R.C. (2005) Cultura in vitro de Embriões e de Gemas de Mudas de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). *ACTA Amazônica* 35: 29 – 33.
- Hansen, J. (1989) Influence of cutting position and temperature during rooting on adventitious root formation and axillary bud break of *Stephanotis floribunda*. *Sci Hortic-Amsterdam* 40: 345 – 354.
- Hartmann, H. y Kester, D. (1987) *Propagación de plantas: principios y prácticas*. Continental, México, 760 p.
- Hartmann, H.T.; Kester, D.E.; Davies Junior, F.T. y Geneve, R.L. (1997) *Plant propagation: principles and practices*. Prentice-Hall, New Jersey, Estados Unidos de Norteamérica, 770 p.
- Hartmann, H.T.; Kester, D.E.; Davies Junior, F.T. y Geneve, R.L. (2002) *Plant propagation: principles and practices*. Prentice Hall, New Jersey, Estados Unidos de Norteamérica, 880 p.
- Hartmann, H.T.; Kester, D.E.; Davis Júnior, F.T. y Geneve, R.L. (2011) *Plant propagation: principles and practices*. Englewood Clippis, New York, Estados Unidos de Norteamérica, 900 p.
- Hatzilazarous, S.; Rifaki, N.; Patsou, M.; Kostas, S. y Economou, A.S. (2009) In vitro propagation of *Viburnum dentatum* L. var. *Lucidum* Aiton. *Propag Ornam Plants* 9: 39 – 42.

- Herrera, T.I.; Ono, E.O. y Leal, F.P. (2004) Efeitos de Auxina e Boro no Enraizamento Adventício de Estacas Caulinares de Louro (*Laurus nobilis* L.). Revista do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina – Biotemas 17: 65 – 77.
- Hicks, R.R. y Gladstone, W.T. (1971) Some anatomical aspects of rooting quaking aspen. Proc. 11th Southern Forest Tree Improvement Conf. p. 265 – 274.
- Higashi, E.N.; Silveira, R.L.V.A. y Gonçalves, A.N. (2000) Propagação Vegetativa de *Eucalyptus*: Princípios Básicos e a sua Evolução no Brasil. IPEF, Piracicaba, Circular Tec (192) 11 p.
- Hoagland, D.R. y Arnon, D.I. (1950) The water-culture method for growing plants without soil. Experimental Station: Calif Agri, 347 p.
- Johansen, D.A. (1940) Plant microtechnique. Mcgraw-Hill Book Co., New York, Estados Unidos de Norteamérica, 511 p.
- Jordan, M.; Montenegro, G.; Balboa, O. y Cortes, I. (1985a) Propagación de plantas económicamente importantes en zonas áridas de Chile. Medio Ambiente 7: 53 – 62.
- Jordan, M.; Pedraza, J. y Goreaux, A. (1985b) In vitro propagation studies of three *Prosopis* species (*P. alba*, *P. chilensis* and *P. tamarugo*) through shoot-tip culture. Gartenbauwissenschaft 50: 265 – 267.
- Juárez de Galindez, M.; Giménez, A.M.; Ríos, N. y Balzarini, M. (2005) Modelación de crecimiento en *Prosopis alba* Griseb. empleando dos modelos biológicos. Rev Cienc For Quebracho 12: 34 – 42.
- Julio N. B. (2000) Estudios alozímicos sobre variabilidad, estructura y diferenciación genética en *Prosopis chilensis* (Leguminosae, Mimosoideae) y especies

relacionadas. Disertación (Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas). Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 153p.

Kalil Filho, A.N. (2000) Parafinagem de Tocos e Indução de Raízes de Seringueira em Altamira, PA. Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAPA), EMBRAPA, Comun Tec (49) 13 p.

Kibbler, H.; Johnston, M.E. y Williams, R.R. (2004) Adventitious root formation in cuttings of *Backhousia citriodora* F. Muell 2 Seasonal influences of temperature, rainfall, flowering and auxins on the stock plant. *Sci Horti- Amsterdam* 102: 343 – 358.

Kitomi Y, Ito H, Hobo T, Aya K, Kitano H, Inukai Y (2011) The auxin responsive AP2/ERF transcription factor CROWN ROOTLESS5 is involved in crown root initiation in rice through the induction of OsRR1, a type-A response regulator of cytokinin signaling. *Plant J* 67: 472 – 484

Klass, S.; Bingham, R.L.; Finkner-Templeman, L. y Felker, P. (1985) Optimizing the environment for rooting cuttings of highly productive clones of *Prosopis alba* (mesquite/Algarrobo). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 60: 275 – 284.

Klass, S.; Wright, J. y Felker, P. (1987) Influence of auxins, thiamine, and fungal drenches on the rooting of *Prosopis alba* clone B2V50 cuttings. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 60: 97 – 100.

Koyuncu, F. y Balta, F. (2004) Adventitious root formation in leaf bud cuttings of tea (*Camellia sinensis* L.). *Pakistan J Bot* 36: 763 – 768.

Kramer, P.J. y Kozlowski, T.T. (1972) *Physiology of trees*. United States of America. Traduzido por Gomes, A. M. A. *Fisiologia das árvores*. Lisboa: Caloust Gulbenkian, 745 p.

- Kraus, J.E. y Arduin, M. (1997) Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Universidade Rural, Rio de Janeiro, Brasil, 198 p.
- Kumar, A.; Sood, A.; Palni, L.M.S. y Gupta, A.K. (1999) In vitro propagation of Gladiolus hybrids. *Plant Cell Tiss Org* 57: 105 – 112.
- Kurepin, L.; Haslam, T.; López-Villalobos, A.; Oinam, G. y Yeung, E. (2011) Adventitious root formation in Ornamental Plants: II. The role of plant growth regulators. *Propag Ornament Plants* 11: 161 – 171.
- Lane, W.D. (1978) Regeneration of woody plants from shoot meristem tips. *Plant Sci Lett* 13: 281 – 285.
- Lima, P.C.F. (1999) Recursos genéticos e avaliação do gênero *Prosopis* no Nordeste do Brasil. In: Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro. Petrolina-PE 16 p.
- Lima, D.M.; Biasi, L.A.; Zanette, F.; Zuffellato-Ribas, K.C.; Bona, C. y Mayer, J.L.S (2011) Capacidade de enraizamento de estacas de *Maytenus muelleri* Schwacke com a aplicação de ácido indol butírico relacionada aos aspectos anatómicos. *Rev Bras Pl Med* 13: 422 – 438.
- Ló, S.M.S. y Duarte, M.R. (2011) Morpho-anatomical study of the leaf and stem of pau-alecrim: *Holocalyx balansae*. *Rev Bras Farmacogn.* 21: 4 – 10.
- López C., Maldonado A. y Salim V. (2001) Variación Genética de Progenies de *Prosopis alba*. *Investigación Agraria. Sist Rec For.* 10 (1): 59 – 68.
- López-Villalobos, A.; Haslam, T.; Kurepin, L.; Oinam, G. y Yeung, E. (2011) Adventitious root formation in Ornamental Plants: III. Molecular Biology. *Propag Ornament Plants* 12: 75 – 88.

- Mafia, R.G.; Alfenas, A.C.; Ferreira, E.M.; Zarpelon, T.G. y Siqueira, L. (2005) Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. *Rev Arvore* 29 (6): 843– 851.
- Martínez-Alonso, C.; Kidelman, A.; Feito, I.; Velasco, T.; Alía, R.; Gaspar, M.J. y Majada, J. (2012) Optimization of seasonality and mother plant nutrition for vegetative propagation of *Pinus pinaster* Ait. *New Forest* 43: 651 – 663.
- Mauseth, J.D. (1988) *Plant anatomy*. The Benjamin/Cummings Publishing Company. 560 p.
- Maynard, B.K. y Bassuk, N.L. (1988) Etiolation and banding effects on adventitious root formation. En: *Adventitious root formation in Biasi cuttings* (Eds.: Davies, T.D.; Haissing, B.E. y Sankhla, N.) Dioscorides Press, Portland, 29 – 46.
- Maynard, B.K. y Bassuk, N.L. (1996) Effects of Stock Plant Etiolation, Shading, Banding, and Shoot Development on Histology and Cutting Propagation of *Carpinus betulus* L. *fastigiata*. *J Amer Soc Hort Sci*. 121: 853 – 860.
- Meng, Z.; Tang, H.; Wang, D.; Shao-Xiong, R. y Ren-Dao, L. (2009) A Study of Rooting Characteristics and Anatomical Structure of Feijoa Cuttings. *Agr J* 4: 86 – 90.
- Metcalf, C.R. y Chalk, L. (1957) *Anatomy of the dicotyledons*. Oxford Clarendon Press, 2. 1500p.
- Mottura, M.C.; Finkeldey, R.; Verga, A.R., Gailing, O. (2005) Development and characterization of microsatellite markers for *Prosopis chilensis* and *Prosopis flexuosa* and cross-species amplification. *Molecular Ecol Notes* 5: 487 – 489. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4105034/>

- Naranjo, C.A.; Poggio, L. y Zeiger, E.S. (1984) Phenol chromatography, morphology and cytogenetic in three species and natural hybrids of *Prosopis* (Leguminosae-Mimosoideae). *Syst Evol* 144: 257 – 276.
- Nicoloso, F.; Lazzari, M. y Fortunato, R. (1999) Propagação vegetativa de *Platanus acerifolia* Ait.: (I) efeito de tipos fisiologicos das estacas e epocas de coleta no enraizamento de estacas. *Cienc Rural* 29: 479 – 485.
- Norberto, P.M.; Chalfun, N.N.J.; Pasqual, M.; Veiga, R.D.; Pereira, G.E. y Mota, J.H. (2001) Efeito da época de estaquia e do AIB no enraizamento de estacas de figueira (*Ficus carica* L.). *Cienc Agrotec* 3: 533 – 541.
- Oberschelp, G.P.J. y Marcó, M.A. (2010) Efecto del ácido 3-indolbutírico sobre el enraizamiento adventicio y la altura de plantines clonales de *Prosopis alba* Grisebach. *Rev Cienc For Quebracho* 18: 112 – 119.
- Oliva Cruz, C.A. (2005) Efecto de fitorreguladores enraizantes y la temperatura en el enraizamiento de estacas de *Myrciaria dubia* (HBK) Mc Vaugh, camu camu arbustivo, en Ucayali - Perú. *Folia Amazonica* 2: 19 – 25.
- Oinam, G.; Yeung, E.; Kurepin, L.; Haslam, T. y López-Villalobos, A. (2011) Adventitious root formation in Ornamental Plants: I. General overview and recent successes. *Propag Ornament Plants* 11: 78 – 90.
- Paes, E.; Höger Filho, G.; Zuffellato-Ribas, K.C. y Brito, F. (2006) Estaquia de *Abelia x grandiflora* Hort. ex L. H. Bailey. *Cult Agron* 1: 26 - 36.
- Paiva, H.N. y Gomes, J.M. (1995) Propagação Vegetativa de Espécies Florestais. UFV, Viçosa, Brasil, 40 p.
- Paiva, H.N.; Gomes, J.M.; Couto, L. y Silva, A.R. da (1996) Propagação Vegetativa de Eucalipto por Estaquia. *Informe Agropecuário* 18 (185): 23-27.

- Palacios R., Agulló M. A., Mom M. P., Torregrosa S. y Picca P. (1988) Especies del Género. Taxonomía. Prosopis en Argentina. Documento preliminar elaborado para el Primer Taller Internacional sobre Recurso Genético y Conservación de Germoplasma en Prosopis. FAO, FCA-UNC y FCEy N-UBA 15 – 96.
- Patch, N.L. y Felker, P. (1997) Influence of silvicultural treatments on growth of mature mesquite (*Prosopis glandulosa* var. *glandulosa*) nine years after initiation. *Forest Ecol Manag* 94: 37 – 46.
- Paula, T.A.; Gonçalves, A.N.; Silveira, R.L.V.A. y Higashi, E.N. (2003) Efeito do Potássio na Produção e Enraizamento de Miniestacas de Eucalipto na Presença e Ausência de AIB. 29º Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Ribeirão Preto. SP - Brasil, 13 a18 de julio.
- Peixe, A.; Serras, M.; Campos, C.; Zavattieri, M.A. y Dias, M.A.S. (2007) Estudo histológico sobre a formação de raízes adventícias em estacas caulinares de oliveira (*Olea europaea* L.). *Rev Cienc Agr* 30: 476 – 482.
- Pereira, M.; Oliveira, A.L. de; Gonçalves, A.N. y Almeida, M. de (2005) Efeitos de Substratos, Valores de pH, Concentrações de AIB no Enraizamento de Estacas Apicais de Jaboticabeira [*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg.] *Sci For* 69: 84 – 92.
- Pezzutti, R. (2005) Território Florestal. 2005. Disponible en: <<http://www.territorioidigital.com/notaTF.aspex?c=1503168710245580>>. Acceso en: 14/08/2008. Obra no vista. Cita tomada de Andrejow, G.M.P. e Higa, A.R. (2009).
- Philipson, W.R.; Ward, J.M. y Butterfield, B.G. (1971) *The Vascular Cambium: its development and activity*. Chapman y Hall ltd., Londres, 182 p.

- Pijut, P.M.; Woeste, K.E. y Michler, C.H. (2011) Promotion of Adventitious Root Formation of Difficult-to-Root Hardwood Tree Species. *Horti Reviews* 38: 213 – 251.
- Pio, R.; Ramos, J.D.; Chalfun, N.N.J.; Gontijo, T.C.A.; Mendonça, V.; Carrijo, E.P. y Chagas, E.A. (2006) Propagação de Estacas Apicais de Figueira: Diferentes Ambientes, Ácido Indolbutírico e Tipo de Estaca. *Cienc Agrotec* 30: 1021 – 1026.
- Pivetta, K.; Pedrinho, D.; Fávero, S.; Batista, G. y Mazzini, R. (2012) Época de coleta e ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de espiroleira (*Nerium oleander* L.). *Rev Arvore* 36: 17 – 23.
- Primer Inventario Nacional de Bosques Nativos: Informe Regional Parque Chaqueño (2007) - 1ª ed. – Buenos Aires: Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación, 91 p.
- Primer Inventario Nacional de Bosques Nativos: Informe Regional Espinal (2007) - 1ª ed. – Buenos Aires: Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación, 62 p.
- Prokopiuk, D.; Cruz, G.; Grados, N.; Garro, O. y Chiralt A. (2000) Estudio comparativo entre frutos de *Prosopis alba* y *Prosopis pallida*. *Multequina* 9: 35 – 45
- Rahman M.; Dayanandan S. y Rajora O.P. (2000) Microsatellite DNA markers in *Populus tremuloides*. *Genome* 43: 293 – 297.
- Rasmussen, A. y Hunt, M. (2010) Maturation delays the cellular stages of adventitious root formation in pine. *Aust Forest Res* 73: 41 – 46.
- Rasmussen, A.; Smith, T.E. y Hunt, M.A. (2009) Cellular stages of root formation, root system quality and survival of *Pinus elliottii* var. *elliotti* x *P. caribaea* var.

- hondurensis cuttings in different temperature environments. *New Forest* 38: 285 – 294.
- Raven, P.H.; Evert, R.F. y Eichhorn, S.E. (2007) *Biología vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 7.ed. 830 p.
- Regonezi, C.; Klimaszewska, K., Castro, M.R.; Lima, M.; De Oliveira, P. y Zavattieri, M.A. (2010) Adventitious rooting of conifers: influence of physical and chemical factors. *Tree* 24: 975 – 992.
- Rey, H.Y (2004) Conservación in vitro de germoplasma de *Arachis pintoi* (Leguminosae). *Disertación (Doctorado en Recursos Naturales)*, Corrientes, Universidad Nacional del Nordeste. 119 p.
- Rocha, P. y Niella, F. (2002) Efecto de tratamientos inductivos en el enraizamiento de estacas de *Pinuselliottii* x *caribaea* y *P. taeda*. IX Jornadas Técnicas Forestales. INTA-FCF-ME y RNR y T, Eldorado, Misiones, Argentina.
- Rohlf F.J. (1998) *NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Applied Biostatistics Inc.
- Ruzin, S.E. (1999) *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press, New York, Estados Unidos de Norteamérica, 322 p.
- Sachs, R.M.; Loreti, F. y De Bie, J. (1964) Plant rooting studies indicate sclerenchyma tissue is not restricting factor. *Calif Agr* 18: 4 – 5.
- Santos, G.A.; Xavier, A.; Wendling, I. y Oliveira, M.L. (2000) Uso da Miniestaquia na Propagação Clonal de *Cedrela fissilis* (Cedro Rosa). VI Congresso e Exposição Internacional sobre Florestas. Porto Seguro, Brasil. 203 p.

- Santos, A.P. dos; Xavier, A.; Oliveira, M.L. de; Reis, G.G. (2005) Efeito da estaquia, miniestaquia, microestaquia, micropropagacao no desempenho silvicultural de *Eucalyptus grandis*. *Scientia Forestalis* (68): 29 – 38.
- Schreiber, L.R. y Kawase, M. (1975) Rooting of cuttings from tops and stumps of American elm. *HortScience* 10: 615 p.
- Scocchi, A. M. (2005) Conservación in vitro de Germoplasma de Paraíso (*Melia azedarach* L.). Disertación (Doctorado en Recursos Naturales), Corrientes, Universidad Nacional Del Nordeste. 134 p.
- Senilliani, M.G. y Navall, M. (2006) Parámetros dasométricos de plantaciones de *Prosopis alba* Griseb. del área de riego de la Provincia de Santiago del Estero. 2º Jornadas Forestales de Santiago del Estero. Santiago del Estero, Argentina, junio de 2006.
- Silva, F.A.S. y Azevedo, C.A.V. (2009) Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. World Congress On Computers In Agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers.
- Simpson, B.B. (1977) Breeding systems of dominant perennial plants of two disjunct warm desert ecosystem. *Oecologia* 27: 203 – 226.
- Sivori, E.M.; Montaldi, E.R. y Caso, O.H. (1986) Fisiología vegetal. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina, 117p.
- Sorin, C.; Busselli, J.D.; Camus, I.; Ljung, K.; Kowalczyk, M.; Geiss, G.; Mckhann, H.; Garcion, C.; Vaucheret, H.; Sandberg, G. y Bellini, C. (2005) Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana* require ARGONAUTE1. *Plant Cell* 17: 1343 – 1359.

- Souza, J.C.A.V. de (2007) Propagação Vegetativa de Cedro Australiano (*Toona ciliata* M. Roem) por Miniestaquia. Disertación (Tesis de Maestría en Producción Vegetal), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Brasil, 41p.
- Souza, C.C. (2012) Padrões de miniestacas e densidade de minicepas na propagação clonal de *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla*. Disertación (Tesis de Maestría), Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 47 p.
- Souza, J.C.A.V. de; Barroso, D.G.; Carneiro, J.G.A.; Teixeira, S.L. y Balbinot, E. (2009) Propagação vegetativa de cedro australiano (*Toona ciliata* M. Roemer) por miniestaquia. *Rev Arvore* 33: 205 – 213.
- Souza, C.C.; Xavier, A.; Leite, F.P.; Santana, R.C. y Leite, H.G. (2013) Padrões de miniestacas e sazonalidade na produção de mudas clonais de *Eucalyptus grandis* Hill X *E. urophylla* S. T. Black. *Rev Arvore* 37: 67 – 77.
- Souza, J.C.A.V. de; Bender, A.G.; Tivano, J.C.; Barroso, D.G.; Mroginski, L.A.; Vegetti, A.C. y Felker, P. (2014) Rooting of *Prosopis alba* mini-cuttings. *New Forest* 45: 745 – 752.
- Syros, T.; Yupsanis, T.; Zafiriadis, H. y Economou, A. (2004) Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. *J. Plant Physiol.* 161: 69 – 77.
- Tabone, T.J.; Felker, P.; Bingham, R.L.; Reyes, I. y Loughrey, S. (1986) Techniques in the shoot multiplication of the leguminous tree *Prosopis alba* Clone B2V50. *Forest Ecol Manag* 16: 191 – 200.
- Tarragó, J.; Sansberro, P.; Filip, R.; López, P.; Gonzales, A.; Luna, C y Mroginski, L. (2004) Effect of leaf retention and flavonoids on rooting of *Ilex paraguensis* cuttings. *Sci Hortic-Amsterdam* 103: 479 – 488.

- Teixeira, D. do A. (2001) Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem (*Puccinia psidii*) e à mancha de *Cylindrocladium candelabrum* mediadas por rizobactérias em *Eucalyptus* spp. Dissertação (Tesis Doctoral en Agronomía - Fitopatología), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.
- Teixeira, J.B. (2006) Produção de mudas clonais em biofábricas e uso de biorreator. EMBRAPA-CENARGEN, Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Documentos (180).
- Titon, M. (2001) Propagação clonal de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia e microestaquia. Dissertação (Mestrado em Cienc Florest) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 65 p.
- Titon, M.; Xavier, A. y Otoni, W.C. (2002) Dinâmica do Enraizamento de Microestacas e Miniestacas de Clones de *Eucalyptus grandis*. *Rev Arvore* 26: 665 – 673.
- Titon, M.; Xavier, A.; Otoni, W.C. y Reis, G.G. (2003) Efeito do AIB no Enraizamento de Miniestacas e Microestacas de Clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. *Rev Arvore* 27: 1 – 7.
- Titon, M.; Xavier, A. y Otoni, W.C. (2006) Clonal propagation of *Eucalyptus grandis* using the mini-cutting and micro-cutting techniques. *Sci For* 71: 109 – 117.
- Tonello, K.C. (2004) Melhoramento de Essências Florestais. *Rev Madeira* 83: 60 – 62.
- Torres, D.; Bennadji, Z.; Cantero, G.; Lemos, J.; Trujillo, I. (2008) Identificación de genotipos de *Eucalyptus grandis* mediante marcadores microsatélites: Programa Nacional de Producción Forestal. *Rev INIA* 29 – 31.

- Tortorelli, L.A. (2009) Maderas y bosques argentinos. Orientación Gráfica, Buenos Aires, 515 p.
- Valmorbida, J.; Fernandes Boaro, C.; Lessa, A. y Salerno, A. (2008) Enraizamiento de estacas de *Trichilia catigua* A. Juss (*catigua*) em diferentes estações do ano. *Rev Arvore*. 3: 435 – 442.
- Vargas, G.; Arellano Ostoia, G. y Soto Hernández, R. (1999) Enraizamiento de estacas de *Icaco* (*Chrysobalanus icaco* L.) sometidas a aplicaciones de auxinas. *Bioagro* 11: 103 – 108.
- Ventín, A.M.; García, S.E.; Corace, J.J.; Martina, P.E. y Aeberhard, M.R. (2006) Estudio de propiedades físico-mecánicas - termo-físicas de especies maderables de uso alternativo del bosque chaqueño aplicables a la construcción. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. UNNE, Agosto, Corrientes, Argentina p. T-088.
- Verga A.R. 1995. Genetic study of *Prosopis chilensis* y *Prosopis flexuosa* (Mimosaceae) in the dry Chaco of Argentina. *Disertación (Tesis Doctoral)*. Göttingen Research Notes in Forest Genetics. Abteilung für Forstgenetik und Forstpflanzensüchtung der Universität Göttingen.
- Verga A.R, (2001) Protocolo. Isoenzimas sobre gel de almidón para semillas de *Prosopis* sp. Laboratorio de Fisiología Vegetal. IFFIVE-INTA. Córdoba, Argentina. 6 pp.
- Verga, A.; Córdoba, A.; Mottura, M.; López Lauenstein, D.; Melchiorre, M.; Joseau, J.; Carranza, C.; Ledesma, M.; Recalde, D.; Tomalino, L.; Mendonza, S. y Vega, R. (2005) El proyecto algarrobo del INTA. *Genética y Mejoramiento*. *Revista de Información sobre Investigación y Desarrollo Agropecuario Forestales IDIA XXI INTA* (8): 201 – 206.

- Verstraeten, I.; Beeckman, T.; Geelen, D.; Verstraeten, I.; Beeckman, T. y Geelen, D. (2013) Adventitious root induction in *Arabidopsis thaliana* as a model for in vitro root organogenesis. *Methods Mol Biol.* 959: 159 – 75.
- Verzino, G. y Joseau, J. (2005) El banco nacional de germoplasma de *Prosopis*: Conservación de recursos forestales nativos en Argentina- 1a ed. – Córdoba, 172p.
- Verzino, G.; Carranza, C.; Ledesma, M.; Joseau, J. y Di Rienzo, J. (2003) Adaptive genetic variation of *Prosopis chilensis* (Mol) Stuntz Preliminary results from one test-site. *Forest Ecol Manag* 175: 119 – 129.
- Weaver, R. (1976) Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Trillas, México, 622 p.
- Wendling, I. y Xavier, A. (2001) Gradiente de Maturação e Rejuvenescimento Aplicado em Espécies Florestais. *Flor Amb* 8: 187 – 194.
- Wendling, I. y Xavier, A. (2003) Miniestaquia seriada no rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus*. *Pesq. Agrop. Bras.* 4: 475 – 480.
- Wendling, I. y Xavier, A. (2005) Influência do ácido indolbutírico e da miniestaquia seriada no enraizamento e vigor de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. *Rev Arvore* 6: 921 – 930.
- Wendling, I.; Xavier, A. y Titon, M. (1999) Miniestaquia na Silvicultura Clonal de *Eucalyptus*. *Folha Flor* 94: 16 – 17.
- Wendling, I.; Xavier, A.; Gomes, J.M.; Pires, I.E. y Andrade, H.B. (2000) Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. *Rev Arvore* 24: 181 – 186.

- Westwood, M.N. (1982) Fruticultura de zonas templadas. Mundi Prensa, Madrid, España. 461 p.
- Wilson, P.J. (1998) Environmental preferences of Eucalyptus globulus stem cuttings in one nursery. New Zeal J For Sci 28: 304 – 315.
- Withers, L.A. y Engelmann, F. (1998) In vitro conservation of plant genetic resources. In: Agricultural Biotechnology. Altman A (ed.). Marcel Dekker. New York 57 – 88.
- Wojtusik, T. y Felker, P. (1993) Inter-species graft incompatibility in Prosopis. Forest Ecol Manag 59: 329 – 340.
- Wojtusik, T.; Felker, P.; Russell, E.J. y Bengé, M.D. (1993) Cloning of erect, thornless, non-browsed nitrogen-fixing trees of Haiti's principal fuelwood species (Prosopis juliflora). Agrofor Syst 21: 293– 300.
- Xavier, A. (2002) Silvicultura clonal I: princípios e técnicas de propagação vegetativa (Caderno Didático, n.92). UFV, Viçosa, Brasil, 64p.
- Xavier, A. y Comério, J. (1996) Microestaquia: Uma Maximização da Micropropagação de Eucalyptus. Rev Arvore 20: 9 – 16.
- Xavier, A. y Wendling, I. (1998) Miniestaquia na Clonagem de Eucalyptus. Sociedade de Investigações Florestais, Viçosa. Informativo Tec (11) 10p.
- Xavier, A.; Santos, G.A.; Wendling, I. y Oliveira, M.L. (2003a) Propagação Vegetativa de Cedro-Rosa por Miniestaquia. Rev Arvore 27: 139 – 143.
- Xavier, A.; Santos, G.A. y Oliveira, M.L. (2003b) Enraizamento de miniestaca caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (Cedrela fissilis Vell.). Rev Arvore 27: 351 – 356.

- Xavier, A.; Wendling, I. y Silva, R.L. da (2009) *Silvicultura clonal - Princípios e Técnicas*. UFV, Viçosa, Brasil, 272 p.
- Xavier, A.; Wendling, I. y Silva, R.L. da (2013) *Silvicultura clonal - Princípios e Técnicas*. UFV, Viçosa, Brasil, 277 p.
- Yap V.I. y Nelson J.R. (1996) WinBoot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. IRRI (Int. Rice Res. Inst.) Res Pap Ser (14).
- Zarate, M. (2012) Manejo de la poda y la densidad de plantación en el crecimiento y calidad de forestaciones de Algarrobo Blanco (*Prosopis alba*). *Producción Forestal*, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, Buenos Aires, 4: 32 – 35.
- Zimmermann, F.J.P. (2004) *Estatística aplicada à pesquisa agrícola*. Santo Antônio de Goiás, EMBRAPA Arroz e Feijão, 402 p.
- Zuffellato-Ribas, K.C. y Domingos Rodrigues, J. (2001) Relações entre épocas do ano e diferentes concentrações de ácido indol butírico no enraizamento de estacas de *Eucalyptus grandis*. *Bol. Pesq. Fl.* 42: 71 – 80.

ANEXO 1

Caracterización Cinética e Isoenzimática de Peroxidasas en Miniestacas y Estacas de *Prosopis alba*



I. OBJETIVO

Determinar la actividad de las enzimas peroxidasas con el propósito de conocer su correlato con las fases de enraizamiento adventicio en algarrobo blanco.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

La determinación de las enzimas peroxidasas (POXs) fueron realizadas en los Laboratorios del IBONE según la técnica descrita en Tarragó y col. (2004). El material vegetal analizado consistió en brotes (10-12 mm longitud) provenientes de las estacas y miniestacas. Se realizó el fraccionamiento y la extracción de POXs mediante el empleo del método espectrofotométrico continuo.

Para la cuantificación de Peroxidasas en ensayos de enraizamiento en *Prosopis alba* se realizó un muestreo tomando 4 cm de la base de las estacas y miniestacas inducidas.

Los tiempos de muestreo fueron 0 días, 2d, 4d, 8d, 12d, 16d, 20d y 24 días. Para cada tiempo se emplearon 3 miniestacas ó estacas. Las muestras tomadas correspondieron al pool de clones que respondieron mayor y menor capacidad de enraizamiento (Tabla 1).

Tabla A.1.- Material muestreado para determinación de enzimas peroxidasas (POXs).

| Material Vegetal | Comportamiento | Concentración de IBA (mg L⁻¹) |
|-------------------------|--------------------------------|---|
| | | 0 |
| Miniestacas | Mayores tasas de enraizamiento | 6000 |
| | Menores tasas de enraizamiento | 3000 |
| Estacas | Mayores tasas de enraizamiento | 3000 |

III. RESULTADOS PARCIALES Y DISCUSIÓN

Los valores de actividad enzimática de las muestras correspondientes a miniestacas de buen comportamiento sin agregado de hormona resultaron aleatorios y no pueden ser considerados para el análisis. Lo que muestra la variabilidad de la concentración endógena de hormonas según el clon utilizado para la propagación.

Las curvas representan la cinética de inducción de peroxidasas de las miniestacas del pool de clones de buen enraizamiento, tratamiento IBA 6000 mg L⁻¹.

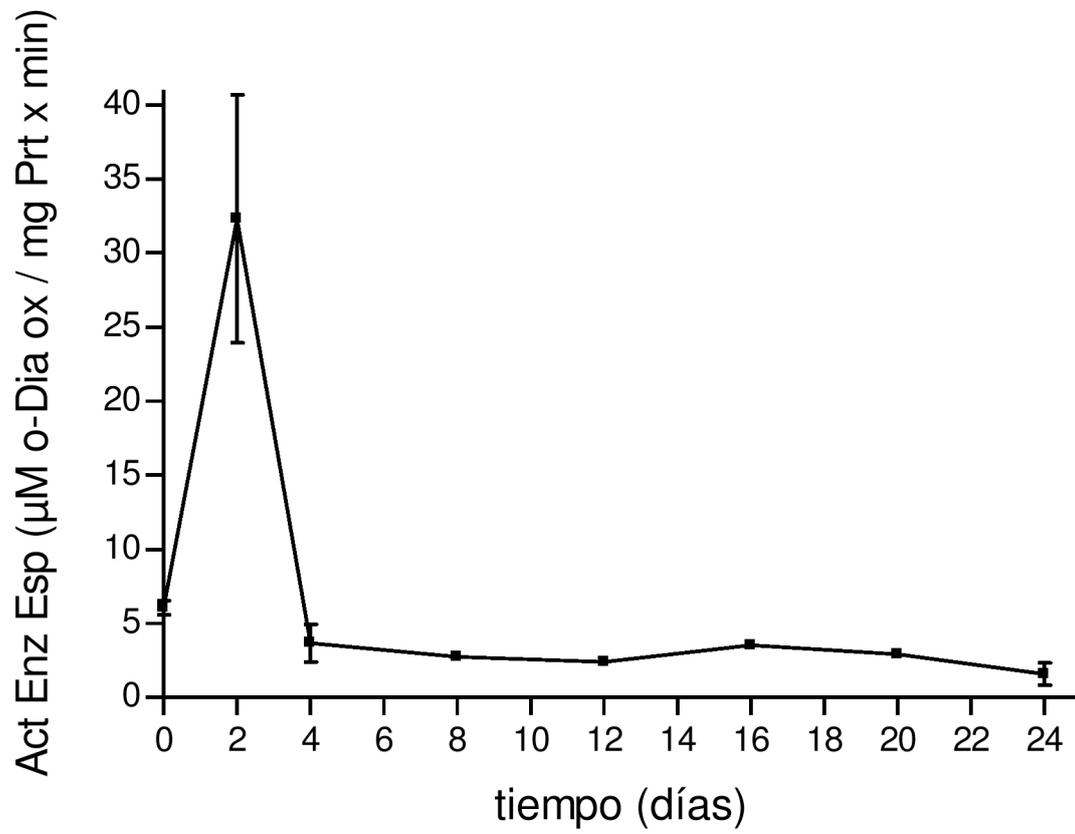


Figura A.1.- Cuantificación de Peroxidasas de miniestacas de *Prosopis alba* que presentaron mayor capacidad de enraizamiento.

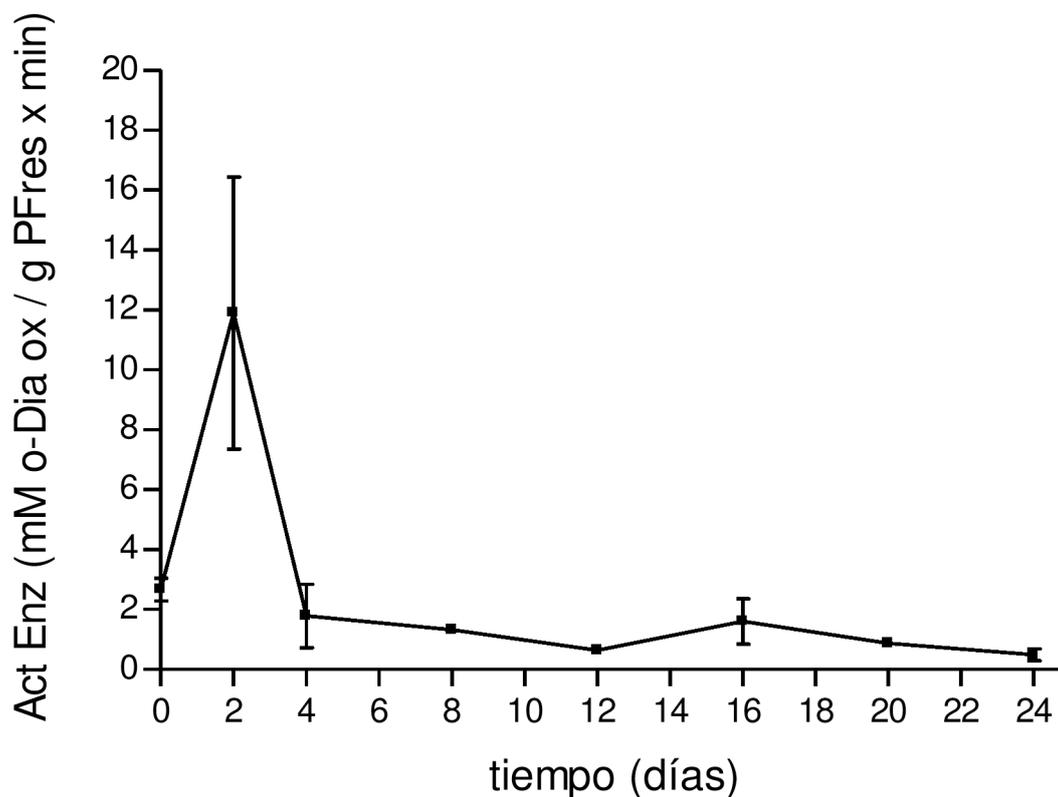


Figura A.2.- Cuantificación de Peroxidasas de miniestacas de *Prosopis alba* que presentaron mayor capacidad de enraizamiento.

La cuantificación de actividad enzimática para las miniestacas de buen comportamiento muestra un pico de inducción de peroxidasas a tiempo 2 días, que se acentúa cuando se mide actividad específica en base a proteína. Esto indica que una parte importante del total de proteínas presentes a ese tiempo, corresponden a peroxidasas solubles medidas con sustrato O-dianisidina (una real síntesis de novo).

Esto indica además, que la inducción de peroxidasas se produce a tiempos muy tempranos en el enraizamiento.

Falta completar las muestras restantes para saber si se podría relacionar el comportamiento frente al enraizamiento con la síntesis de peroxidasas solubles.

Con la utilización de la técnica de miniestacas el rejuvenecimiento, entre otros factores que promueven el enraizamiento, es tal que muchas especies no presentan diferencias entre tratamientos con IBA y sin IBA, dependiendo de la especie y/o clon utilizado.

IV. CONCLUSIONES PRELIMINARES

La cuantificación de actividad enzimática presentó un pico de inducción de peroxidasas a tiempo 2 días, que se acentúa cuando se mide actividad específica en base a proteína. Esto indica que una parte importante del total de proteínas presentes a ese tiempo, corresponden a peroxidasas solubles medidas con sustrato O-dianisidina. Esto indica además, que la inducción de peroxidasas se produce a tiempos muy tempranos en el enraizamiento.

Los datos son los primeros resultados de determinación de la actividad de las enzimas peroxidasas en el enraizamiento adventicio de *Prosopis alba* es necesario más una repetición del ensayo en el tiempo para corroborar los datos obtenidos en este primero ensayo. Siendo esta una nueva línea de investigación que puede llegar a aportar resultados importantes y novedosos en la rizogénesis de esta especie.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Tarragó, J.; Sansberro, P.; Filip, R.; López, P.; Gonzales, A.; Luna, C y Mroginski, L. (2004) Effect of leaf retention and flavonoids on rooting of *Ilex paraguensis* cuttings. *Sci Horti-Amsterdam* 103: 479 – 488.