

INFLUENCIA DEL GRADO DE LIGNIFICACIÓN DE LOS PROPÁGULOS DE JARDÍN Y MINIJARDÍN CLONAL EN EL ENRAIZAMIENTO DE ESTACAS Y MINIESTACAS DE *Prosopis alba* Griseb.

ARAUJO VIERA DE SOUZA, J. C.¹; BENDER, A.G.¹; REUTEMANN, A.G.^{1,2};

PERRETA, M.G.^{1,2}; CÓRDOBA, M. S.¹; TIVANO, J. C.¹; BARROSO, D. G.³

GARIGLIO, N. F.¹; MROGINSKI, L. A.⁴ & VEGETTI, A. V.²

RESUMEN

Prosopis alba posee potencial para la producción forestal y forrajera, destacándose su utilización en zonas áridas y semi-áridas. La especie, considerada de difícil enraizamiento, se propaga comercialmente mediante semillas. Su clonación permitiría cultivar materiales de interés silvícola altamente productivos y en un menor tiempo. El objetivo de este trabajo fue analizar el grado de lignificación de estacas y miniestacas de *P. alba* y su relación con su capacidad de enraizamiento. Los brotes obtenidos del jardín y minijardín clonal fueron inducidos al enraizamiento con diferentes concentraciones de IBA. Se realizaron cortes anatómicos de los brotes, previo a la inducción del enraizamiento y 40 días posteriores al mismo para observar la lignificación de estos materiales y relacionarlos con estacas y miniestacas enraizadas. Las miniestacas con mayor grado de juvenilidad y de etiolación presentaron menor grado de lignificación y lograron mayores porcentajes de enraizamiento (99,6%) con respecto a las estacas (7,6%). Se observó que la utilización de la técnica de miniestacas asociada a la de etiolación son promisoras para la propagación vegetativa de *P. alba* y posiblemente de otras especies nativas de difícil enraizamiento.

Palabras clave: Propagación vegetativa, rizogénesis, etiolación, algarrobo, especies nativas.

1.- Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral. Kreder 2805. (3080) Esperanza, Santa Fe, Argentina. Email: jaraujo@fca.unl.edu.ar

2.- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Kreder 2805. (3080) Esperanza, Santa Fe, Argentina.

3.- Laboratorio de Fitotecnia, Universidad Estadual del Norte Fluminense, Darcy Ribeiro. Av. Alberto Lamego 2000. Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

4.- Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste. Cabral 2131. (3400) Corrientes, Argentina. Manuscrito recibido el 30 de marzo de 2020 y aceptado para su publicación el 18 de septiembre de 2020.

ABSTRACT

Influence of the propagules lignification degree of the garden and minigarden clonal on the cuttings and mini cuttings rooting of *Prosopis alba* Griseb.

Prosopis alba has high potential as forest material and important forage features for arid and semi-arid areas. *Prosopis alba* is commercially propagated by seeds, because of its rooting difficulties. Its cloning would allow to cultivate highly productive silvicultural materials in less time. The aim of this work was to analyze the lignification degree of *P. alba* cuttings and mini-cuttings and its relation with the rooting capacity. The sprouts obtained from the garden and clonal minigarden were rooted with different concentrations of IBA. Serial transversal sections of the sprouts were carried out before rooting induction and 40 days after this process to observe the lignification of these material and its relationships with rooted cuttings and mini-cuttings. Results show that mini-cuttings with greater juvenility and etiolation degree presented lower lignification degree and reached higher rooting percentages (99.6%) with respect to cuttings (7.6%). Mini-cutting and etiolation techniques are promising for the vegetative propagation of *P. alba* and other native species with difficult rooting.

Key words: vegetative propagation, rhizogenesis, etiolation, mesquite, native species.

INTRODUCCIÓN

Prosopis alba Griseb. es una especie nativa de Sudamérica, con gran importancia en la composición arbórea de zonas áridas y semiáridas del mundo. Es una especie de gran potencial para la producción de material forestal y la de mayor importancia económica dentro del género. *P. alba* es empleada tradicionalmente de forma intensiva como madera para muebles, en la construcción, para la producción de leña y carbón, en la alimentación animal dentro de sistemas silvopastoriles y en la alimentación humana. Por otra parte, es una especie importante como fijadora de nitrógeno (Felker *et al.* 2001, Ewens y Felker 2010).

La propagación vegetativa de especies arbóreas de importancia forestal constituye

una herramienta valiosa desde el punto de vista productivo ya que permite acelerar el desarrollo de la forestación reduciendo los turnos de corte y la propagación de materiales más productivos, de mejor calidad y con características silvícolas de importancia. A pesar del elevado interés por realizar la producción clonal a gran escala de *P. alba*, hasta la actualidad no se han logrado protocolos eficientes que garanticen el establecimiento, desarrollo y regeneración de esta especie (Felker *et al.* 2005, Felker *et al.* 2008, Araujo Vieira de Souza *et al.* 2014).

La técnica de propagación vegetativa a través de estacas asociada a la aplicación de ácido indolbutírico (IBA) puede ser utilizada para especies forestales nativas de interés comercial. Su utilización puede ser limitada por la falta de métodos eficientes

de rejuvenecimiento de material adulto y de técnicas de manejo adecuadas en el ambiente de propagación (Dias *et al.* 2015).

En *P. alba* la regeneración mediante estacas resulta muy difícil de emplear dada la baja capacidad de enraizamiento de esta especie (Ewens *et al.* 2012, Araujo Vieira de Souza *et al.* 2014, Ewens y Felker, 2003, Araujo Vieira de Souza, 2015). En algunas plantas, la capacidad de enraizamiento de las estacas se relaciona con su estructura anatómica y con su grado de lignificación. La reducción de la lignificación de los tejidos puede aumentar la capacidad de enraizamiento en estacas y miniestacas de especies leñosas (Biasi *et al.* 2002, Borges *et al.* 2011, Schwarz *et al.* 2015).

Como en muchos otros representantes de la subfamilia Mimosoideae, los tallos jóvenes de *P. alba* presentan un anillo de esclerénquima lindante con las capas más internas del córtex. Este anillo puede ser continuo o aparecer interrumpido, y puede constituir una barrera mecánica para el desarrollo de raíces adventicias (Caro *et al.* 2002, Evert 2006, Peixe *et al.* 2007, Amis-sah *et al.* 2008, Schwarz *et al.* 2015).

En la propagación vegetativa la utilización de las técnicas de miniestacas y de etiolación permiten obtener propágulos con un menor grado de lignificación. La técnica de miniestacas, consiste en la utilización de brotes de plantas madres, los que son rejuvenecidos a través de la ruptura de la dominancia apical por la poda drástica de plantas madres. Mientras que la etiolación consiste en la reducción de la lignificación de los tejidos a través de la reducción de la intensidad de luz a la que crecen los brotes de las plantas madres que serán utilizados como propágulos (Biasi *et al.* 2002, Alfenas *et al.* 2009, Borges *et al.* 2011, Araujo Vieira de Souza *et al.* 2014). Las técnicas de estacas y miniesta-

cas se diferencian en función del manejo de sus plantas madres y no del tamaño de sus propágulos (Alfenas *et al.* 2009).

Este trabajo tuvo como objetivo observar por medio de estudios anatómicos si efectivamente ocurre una reducción del grado de lignificación de los propágulos de *P. alba* al utilizar la técnica de miniestacas en relación a la técnica de estacas y al aplicar la técnica de etiolación. También, se pretende evaluar la influencia del grado de lignificación en los ensayos de enraizamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos de enraizamiento de estacas y miniestacas fueron realizados en los Laboratorios de Producción Vegetal y de Morfología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral (Latitud 31° 26'31" S y Longitud 60°56'25" O) en dos años consecutivos. En el momento de inducción del enraizamiento del "año 1" las plantas madres del jardín y minijardín clonal (donantes de propágulos para el enraizamiento) poseían 18 meses y en el "año 2" poseían 30 meses.

Para la preparación de las *estacas* fueron utilizados brotes jóvenes provenientes de un *jardín clonal* y para la preparación de las *miniestacas* fueron utilizados brotes rejuvenecidos de un *minijardín clonal*. El rejuvenecimiento de los brotes del minijardín se obtuvo a través de la ruptura de la dominancia apical por la poda drástica de las plantas madres.

En el ensayo de enraizamiento del "año 2" las plantas madres del minijardín clonal fueron sometidas a la aplicación de técnicas de etiolación por medio del incremento de la densidad de plantas y sombreado.

Material Vegetal

Las plantas madres del jardín y del minijardín fueron originadas de plantas provenientes del rodal semillero de la localidad de Vera (Santa Fe, Argentina) (Latitud 29° 27'55'' S y Longitud 60°12'58'' O). Cada planta madre representa un genotipo de medio hermanos. Lo anterior posibilita la clonación de familias superiores.

Formación y manejo del jardín y del minijardín clonal

El jardín clonal fue implantado a campo y estaba 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 y fueron fertilizadas con 3 ml de solución Hoagland al 50% (Hoagland y Arnon 1950) cada 15 días y previo a las colectas de los brotes. Los brotes jóvenes fueron cosechados para el ensayo de enraizamiento de estacas del “año 1” y “año 2” presentando un total 108 brotes por año. Se utilizaron entre cuatro y cinco brotes por planta madre del jardín clonal en cada año.

El minijardín clonal estuvo constituido por 55 plantas madres distribuidas en 5 parcelas, con 11 plantas cada una, dispuestas al azar y mantenidas en invernadero. Para su formación fue utilizada la metodología descrita por Araujo Vieira de Souza *et al.* (2009) con modificaciones en el régimen de temperatura, luminosidad, riego y fertilización. El mismo fue implantado en cámara de crecimiento con fotoperiodo de 14 h, intensidad de radiación de 400 mE PAR, temperatura día/noche de 26/19 °C y humedad relativa del 60% donde permanecieron 24 meses. Luego, fueron trasladadas al invernadero donde se sometieron a temperaturas

día/noche de 26/15 °C y humedad relativa del ambiente de 71,5%. En la producción comercial de plantines por miniestacas las plantas madres normalmente quedan de dos a cinco años en estas condiciones. Se modificó el ambiente del minijardín clonal para aplicar las técnicas de etiolación.

Las plantas madres del minijardín fueron cultivadas en macetas de 276 cm³ con sustrato de compost de residuos sólidos urbanos con 1/4 de arena (Humedad: 45%; pH: 7,1; N total: 0,9%; P₂O₅: 0,9 %; K₂O: 0,6%). Estas fueron fertilizadas con 3 ml de solución Hoagland al 50% (Hoagland y Arnon 1950) cada 15 días y previa a las colectas de los brotes.

Para promover el rejuvenecimiento de las plantas madres y obtener los brotes rejuvenecidos con menor grado de lignificación en el ensayo de enraizamiento de miniestacas, se realizó el corte del ápice de las mismas aproximadamente a 20 cm de la base del tallo cuando éstas presentaron una altura superior a 25 cm. Los brotes rejuvenecidos para el ensayo de enraizamiento fueron cosechados de miniestacas del “año 1” y “año 2”, obteniendo 180 brotes en cada año. De cada planta madre se cosecharon para los experimentos 4 brotes por año.

Ensayo de estacas del “año 2” sometido a técnica de etiolación

En el “año 2” los brotes del jardín clonal a utilizarse para el enraizamiento fueron sometidos a sombreado total a lo largo del brote a partir del momento que las longitudes de los mismos fueron de 10 cm. Para ello, se empleó plástico negro abrochado a lo largo del brote desde de su base hasta la región inferior al ápice, que permaneció sin sombreado.

Ensayo de miniestacas del “año 2” sometido a técnicas de etiolación

Las plantas madres del minijardín clonal en el “año 2” fueron sometidas a tres diferentes técnicas de etiolación con la finalidad de promover un menor grado de lignificación en el material a ser propagado.

Se incrementó la densidad de plantas del “año 2” en relación al “año 1”. La densidad de plantas madres en los ensayos del “año 1” fue de 40 plantas m⁻² y en el “año 2” de 256 plantas m⁻², con menor espaciado entre plantas madres y mayor etiolación de brotes.

En el “año 2” los brotes fueron sometidos también a sombreado parcial y total a lo largo del brote. El sombreado parcial de las plantas madres fue conferido por el uso de media sombra (70%) a partir del momento que el promedio de longitud de los brotes fue de 10 cm y la producción de brotes por planta madre igual a 3,3. El sombreado total del brote fue conferido por el uso de plástico negro abrochado a lo largo de este desde de su base hasta la región inferior al ápice.

Preparación y evaluación de estacas y miniestacas: ensayo de enraizamiento

Para la preparación de las estacas y miniestacas se empleó el procedimiento descrito por Araujo Vieira de Souza et al. (2009). Se obtuvieron brotes juveniles del jardín clonal y rejuvenecidos del minijardín clonal para inducir el enraizamiento. Para ello, se utilizó la porción apical del brote (6 cm de largo) con al menos 3 entrenudos y 3 hojas de las cuales su superficie foliar se redujo al 50%. Posteriormente, fueron sometidas a la aplicación de fungicida (2,5 cm³.L⁻¹ de carbendazim).

Las estacas fueron sometidas a tres tratamientos con IBA solubilizado en hidróxido de potasio (KOH 1 mol. L⁻¹), aplicado por

vía líquida en la base de cada estaca durante 15 segundos a las concentraciones de 0, 3.000 y 6.000 mg.L⁻¹. Igual procedimiento se empleó en las miniestacas, aunque las concentraciones fueron 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 conteniendo sustrato Dynamics 2®. Luego fueron transferidos a cámara de enraizamiento con nebulización intermitente, humedad superior a 80%, temperatura media de 23,6 °C, temperatura media máxima de 35°C, radiación solar 20,48 mJ.m⁻².día y heliofanía efectiva promedio de 9,32 h.día⁻¹. La fertilización fue quincenal con 2 ml tubete⁻¹ de solución nutritiva Bolle Jones (Chaves et al., 2006).

Los experimentos de enraizamiento fueron dispuestos en un diseño de cuatro bloques aleatorizados con cinco tratamientos de IBA en miniestacas y tres en estacas. Hubo nueve propágulos (miniestacas o estacas) por unidad experimental. Los ensayos fueron realizados en dos años consecutivos en primavera.

Luego de 40 días en cámara de enraizamiento se determinó la supervivencia y el porcentaje de miniestacas y estacas enraizadas.

En el material enraizado (plantines clonales) se registró altura, diámetro del tallo, peso de materia fresca de la parte aérea, número de hojas, número de foliólulos, peso de materia fresca, número y longitud total de raíces. Las raíces fueron cuantificadas mediante digitalización de imágenes utilizando el software ImageJ® (Rasband, 1997-2019).

Se utilizó el test de Lilliefors y el de Cochran para determinar la normalidad y homogeneidad de variancias, respectivamente.

te. Posteriormente, los resultados obtenidos se sometieron a análisis de la variancia. Los datos de supervivencia y enraizamiento fueron transformados en arco seno $\sqrt{X/100}$, los datos de número de hojas, de foliólulos y de raíces fueron transformados por $\sqrt{(X+1)}$ y los datos de 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. Para la realización de los procedimientos estadísticos fueron utilizados los programas estadísticos InfoStat (Di Rienzo y col., 2010) y ASSIS-TAT Software (Silva y Azevedo, 2016).

Estudio de las características anatómicas

Los estudios anatómicos fueron realizados en el laboratorio de Anatomía Vegetal de la FCA-UNL. Se tomaron muestras de miniestacas y estacas de todos los tratamientos, previo a la inducción del enraizamiento y al finalizar el ensayo. Las muestras fueron tomadas a 0,5 cm de la base de las miniestacas y estacas. Luego, la mitad de estas muestras fueron fijadas en FAA (fórmula: ácido acético: etanol 70%, 10: 5: 85, v/v/v), y la otra mitad de las muestras fueron conservadas en freezer a -20 °C.

Las muestras fijadas en FAA fueron deshidratadas en una serie de alcohol etílico de concentración creciente, clarificadas con xilol e incluidas en parafina (Ruzin 1999). Luego, mediante 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 a -20 °C se obtuvieron cortes transversales seriados de 10 μm de espesor, mediante micrótopo de congelación, los cuales fueron clarificados con solución de hipoclorito de sodio, lavados con agua y montados en fluoroglucinol-ácido clorhídrico para observar el grado de lignificación de los tejidos de miniestacas (sometidas y no sometidas a etiolación) y estacas (Kraus y Arduin 1997).

Además, fueron cosechados de las plantas madres brotes similares a los que fueron utilizados para la preparación de las miniestacas y estacas y de los cuales se tomaron muestras de la región apical, proximal, media y basal. 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.

Se analizaron en todos los tejidos observados, su grado de lignificación, el desarrollo y evolución del anillo de esclerenquima a lo largo del eje y se compararon con los resultados de los experimentos de enraizamiento.

RESULTADOS

En el ensayo de primavera del “año 1” con utilización de brotes no etiolados se observó una baja supervivencia (20%) y enraizamiento (12,5%) de las miniestacas. La rizogénesis se produjo en la región del nudo más cercano al corte realizado durante su preparación. No se observó enraizamiento de las estacas, habiéndose registrado sólo un 8% de supervivencia de las mismas a los 40 días (Tabla 1).

En el ensayo de miniestacas de primavera del “año 2” con utilización de brotes

etioldados se registraron elevados valores de supervivencia y enraizamiento (96 y 99,6%, respectivamente). Para las estacas del jardín clonal se obtuvieron mejores valores de supervivencia (20%) y enraizamiento (7,6) que en el “año 1”, pero los mismos fueron inferiores a los registrados en miniestacas (Tabla 1).

No se observaron diferencias en función de las concentraciones de IBA en el porcen-

taje de enraizamiento de las miniestacas en el ensayo de primavera del “año 2”. Para las concentraciones de IBA de 0, 3.000, 4.500 y 6.000 mg. L⁻¹ se obtuvo un 100% de enraizamiento y con la dosis de 7.500 mg. L⁻¹ fue del 98% (Tabla 2). No hubo correlación entre el grado de lignificación del anillo de esclerénquima y la concentración de IBA aplicado.

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

Table 1. Percentages of survival (SUPERV) and rooting (ENR) in the mini-cutting and cutting tests in years 1 and 2.

"Año 1" (NO sometidas a etiología)				"Año 2" (con Etiología)			
Miniestacas		Estacas		Miniestacas		Estacas	
SUPERV	ENR	SUPERV	ENR	SUPERV	ENR	SUPERV	ENR
20%	12,5%	8%	0%	96%	99,6%	20%	7,6%

Tabla 2. Porcentaje de enraizamiento y supervivencia de estacas y miniestacas de *Prosopis alba* sometidas a etiología y tratadas con diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (IBA).
Table 2. Percentage of rooting and survival of cuttings and mini-cuttings of *Prosopis alba* subjected to etiolation and treated with different concentrations of indolebutyric acid (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 ($p < 0,05$).

La utilización de IBA influenció el número de hojas y foliólulos, número, peso de materia fresca y longitud total de raíces. Se observó mejor desarrollo radical hasta la dosis de 6.000 mg L⁻¹, mientras que dosis superiores tuvieron efecto negativo (Fig.1). El número de hojas de los plantines se incrementó 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), registrándose una disminución del número de hojas a partir de esta concentración. Igual respuesta se observó en relación a la cantidad de foliólulos hasta su punto óptimo 4.113,5 mg L⁻¹.

La cantidad, peso de materia fresca y longitud de raíces de los plantines tuvieron los siguientes puntos óptimos: 4.840, 3.480 y 3.726 mg L⁻¹, respectivamente (Fig.1).

En los cortes transversales de la región apical de brotes rejuvenecidos de plantas madres del minijardín clonal se observó una epidermis uniestratificada, una capa subepidérmica de colénquima, pocas capas de clorénquima, algunas células taníferas, una capa cortical interna de células grandes (vaina amilífera), el anillo de esclerenquima en formación, haces vasculares colaterales y una región medular con células parenquimáticas grandes en comparación con el tamaño de las células del córtex (Fig.2, A y B).

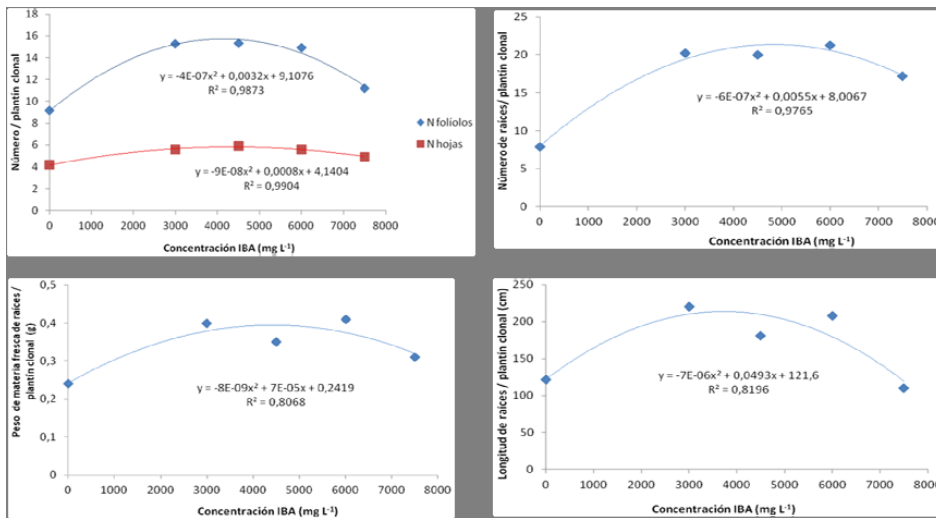


Figura 1. Efecto de la concentración de ácido indolbutírico (AIB) sobre variables de la parte aérea y radical de los plantines clonales de *P. alba* obtenidos a través de miniestacas y sometidas a etiolación a los 40 días.

Figure 1. Effect of the concentration of indolebutyric acid (IBA) on variables of the aerial and radical part of clonal seedlings of *P. alba* obtained through mini-cuttings and subjected to etiolation at 40 days.

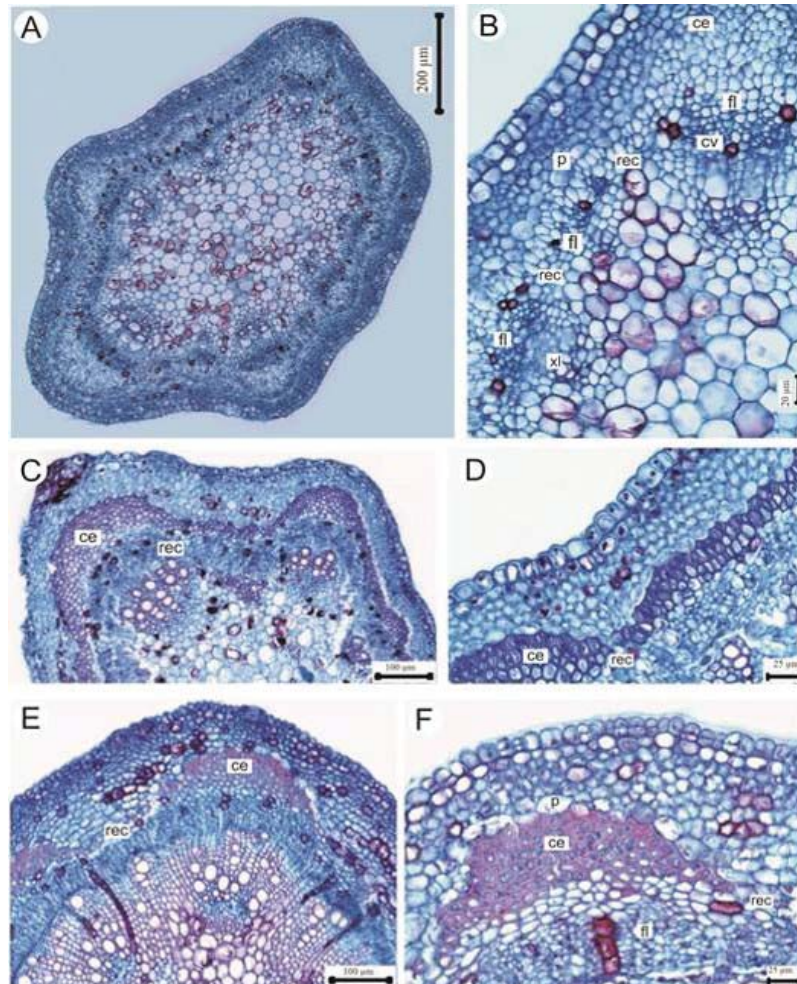


Figura 2. Brotes rejuvenecidos de plantas madres del minijardín clonal de *Prosopis alba* de las cuales se extrajeron propágulos para preparación de miniestacas. A y B: corte transversal de entrenudo de la región apical; C y D: región media del brote; E y F: región basal del brote. Referencias: casquete de esclerénquima (ce); cambium vascular (cv); floema (fl); periciclo (p); región entre casquetes de esclerénquima (rec); xilema (xl).

Figure 2. Rejuvenated stock plants sprout of the stock plant of the clonal minigarden of *Prosopis alba* from which propagules were extracted for the preparation of mini-cuttings. A and B: internode cross section of the apical region; C and D: middle region of the sprout; E and F: basal region of the sprout. References: sclerenchyma cap (ce); vascular cambium (cv); phloem (fl); pericycle (p); region between sclerenchyma caps (rec); xylem (xl).

Desde el ápice hacia la base del brote 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 distintos estados de diferenciación (Fig. 2). También hacia la región proximal del brote, se observó la aparición de cambium vascular, que resultó temprana en los haces vasculares más grandes, y fue más retrasada en los medianos y pequeños; presentándose áreas interfasciculares sin cambium vascular notable (Fig. 2). 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; mientras que las células más internas persistieron mayor tiempo como células de paredes delgadas (Fig. 2, C y D). Finalmente, en regiones más basales del brote todo el casquete floemático de fibras presentó paredes celulares gruesas y esclerificadas (Fig. 2, 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 cantidad de estratos celulares (Fig. 2).

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 de floema secundario hacia el exterior (Fig. 2, E y F). Se determinó que el xilema secundario en las regiones fasciculares era de estructura diferente al xilema secunda-

rio de las regiones interfasciculares. Estas últimas, presentaron menor proporción de vasos y se diferenciaron radios vasculares (Fig. 2). 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. 2). Por fuera del floema secundario apareció el anillo de esclerénquima formado por los casquetes de esclerénquima y regiones entre dichos casquetes (Fig. 2), los que estaban formados por varias capas de fibras de pequeño diámetro y gruesas paredes fuertemente lignificadas. En las regiones entre casquetes se observó 1-2 capas de células grandes de paredes más delgadas y menos lignificadas, siendo algunas células no lignificadas (Fig. 3, A y 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 de la región entre los casquetes de esclerénquima, aumentó hacia la base de la miniestaca (Fig. 2).

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. 4). Del mismo modo dicho grado de lignificación fue mayor en las miniestacas y estacas del primer año, respecto a las del segundo año (Fig. 4, C - E).

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 esclerénquima compuesto a través de las regiones entre casquetes de esclerénquima (Fig. 3,

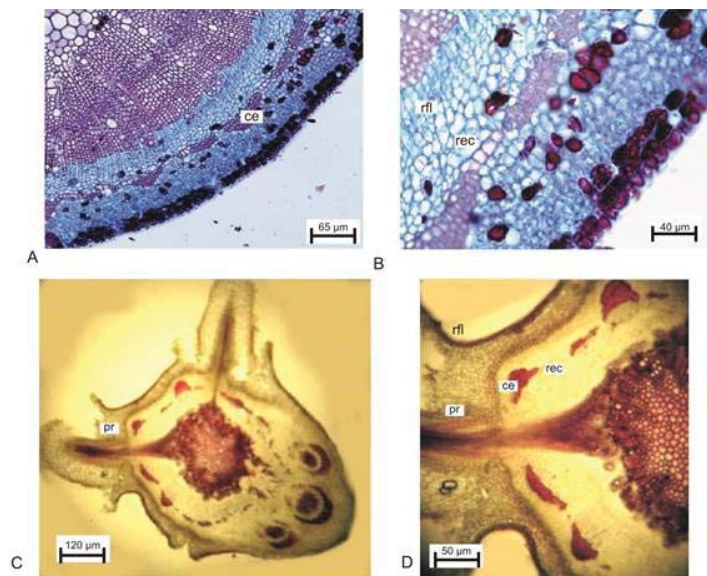


Figure 3. Mini-cuttings of *Prosopis alba* year 1. A: cross-section of the mini-cutting internode before starting the rooting tests; B: enlarged detail of A; C: rooted mini-cutting; D: enlarged detail of C. References: sclerenchyma cap (ce); region between sclerenchyma caps (rec); phloem radio (rfl); radical primordium (pr).

Figure 3. Mini-cuttings of *Prosopis alba* year 1. A: cross-section of the mini-cutting internode before starting the rooting tests; B: enlarged detail of A; C: rooted mini-cutting; D: enlarged detail of C. References: sclerenchyma cap (ce); region between sclerenchyma caps (rec); phloem radio (rfl); radical primordium (pr).

C y D). En las miniestacas se observó enraizamiento en las regiones que mostraron menor grado de lignificación en las paredes celulares, es decir en las regiones entre casquetes de esclerénquima. Para las mismas condiciones de enraizamiento, miniestacas de *P. alba* que presentaron mayor grado de lignificación en esas regiones, no enraizaron (Fig. 4, D).

El menor grado de lignificación de los tejidos promovió tasas superiores de enraizamiento de estacas y miniestacas en *P. alba*.

DISCUSIÓN

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 esclerénquima. El porcentaje de enraizamiento logrado estuvo afectado directamente por el grado de lignificación del propágulo utilizado; cuanto menor fue la lignificación de los brotes utilizados para propagación, mayores fueron las tasas de enraizamiento.

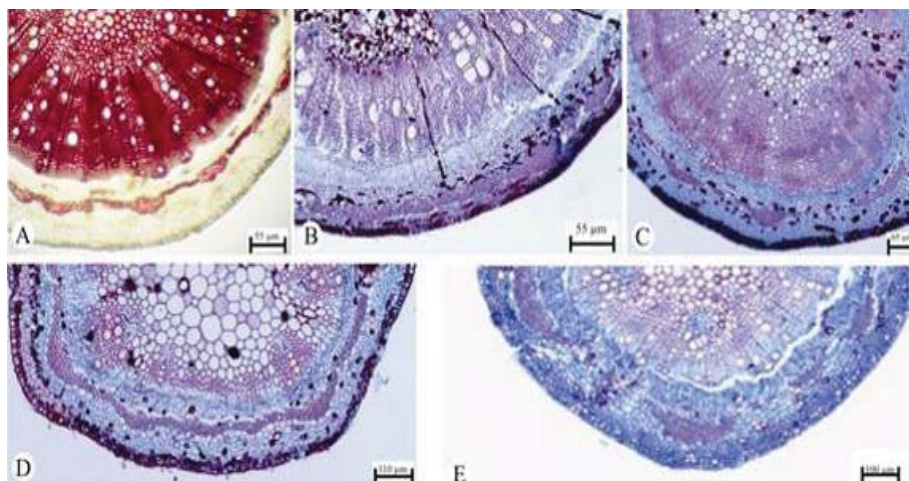


Figura 4. Variaciones en los grados de lignificación y discontinuidad de los anillos esclerenquimáticos de miniestacas y estacas de *Prosopis alba*. A: miniestaca del año 1 que no enraizó; B: estaca del año 1, con mayor grado de lignificación, que no enraizó; C: miniestaca del año 1, con menor grado 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.

Figure 4. Variations in the degrees of lignification and discontinuity of the sclerenchymal rings of mini-stakes and cuttings of *Prosopis alba*. A: Year 1 mini-cutting that did not root; B: cutting of year 1, with a higher degree of lignification, which did not take root; C: mini-cutting of year 1, with a lower degree of lignification, which took root and had higher root production after 40 days; D: year 1 mini-cutting with the highest degree of lignification, which took root but had low root production at 40 days; E: degree of lignification of the minicutting of year 2, grown in a greater etiolation condition and that had 99.6% rooting.

Miniestacas etioladas presentaron menor grado de lignificación que estacas y que miniestacas no etioladas y, consecuentemente, lograron mayores porcentajes de enraizamiento, número y longitud total de raíces. La formación de raíces adventicias es una etapa necesaria en la propagación vegetativa, y debido a ello el interés de este proceso en la silvicultura (Oinam *et al.* 2011). La incapacidad de desarrollar raíces adventicias desde estacas o la pérdida de dicha capacidad que ocurre con la edad de la planta ocasionan pérdidas económicas en la producción de especies forestales (Pijut *et al.* 2011). Es por ello que el proceso de rizogénesis ha interesado a varias áreas de las ciencias y existen numerosas revisiones que muestran los avances en la biología de la formación de raíces adventicias (De Klerk 2002, Geiss *et al.* 2009, Kurepin *et al.* 2011, López-Villalobos *et al.* 2011, Oinam *et al.* 2011). Dentro de las investigaciones realizadas, los estudios histológicos tanto de los ejes como del desarrollo de los primordios radicales constituyen una base de conocimiento para entender la formación de las raíces adventicias (Gahan y George 2008, Oinam *et al.* 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. Esto fue debido a variaciones en el patrón de diferenciación de xilema y floema y al inicio del crecimiento secundario que se produce muy próximo a las regiones apicales en la mayoría de las especies leñosas (Philipson *et al.* 1971).

En el cortex de miniestacas de *P. alba* se observó un anillo de esclerénquima con la típica estructura encontrada en la mayoría de las dicotiledóneas leñosas (Duarte y

Wolf 2005, Ló y Duarte 2011). En los brotes rejuvenecidos de *P. alba* el denominado anillo de esclerénquima estuvo formado por dos regiones: los casquetes de esclerénquima y las regiones entre casquetes. Las discontinuidades en el anillo de esclerénquima se completaron con parénquima y pueden diferenciarse en células de gruesas paredes celulares. Las 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. Lo anterior fue descrito para otras especies leñosas (Amissah *et al.* 2008).

En las miniestacas de *P. alba* que enraizaron se observó que los primordios radicales atravesaban el anillo de esclerénquima a través de las regiones entre casquetes de esclerénquima, es decir, se observó enraizamiento en la región del anillo con menor grado de lignificación. En *P. chilensis* (Caro *et al.* 2002) y en *Olea europea* (Peixe *et al.* 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 presentaron mayor grado de lignificación en esas regiones no enraizaron; resultado también observado en otras especies leñosas (Bastos *et al.* 2005, Amissah *et al.* 2008, Elbasheer y Elkalifa 2010). En *Paulownia fortunei* var. *mikado*, por otra parte, se reporta una excelente producción de raíces en miniestacas gracias a la falta de una barrera anatómica esclerificada (Stuepp *et al.* 2015). Aunque, en otras especies como *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).

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, Amissah *et al.* (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.

El enraizamiento puede verse dificultado por cambios en el grado de maduración de los ejes o por condiciones ambientales (Meng *et al.* 2009, Rasmussen y Hunt 2010, Oinam *et al.* 2011, Pijut *et al.* 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 *et al.* 2005, Druegge *et al.* 2008, Ahkami *et al.* 2009, Bennett y Scheres 2010, Kitomi *et al.* 2011, Verstraeten *et al.* 2013). En relación con ello se conoce que las condiciones ambientales y prácticas de manejo modifican los porcentajes de enraizamiento logrados (Rasmussen *et al.* 2009, Regonezi *et al.* 2010). Algunos de estos cambios pueden modificar el grado de lignificación de los ejes (Hatzilazarous *et al.* 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 (Amissah y Bassuk 2007, Amissah *et al.* 2008). Las diferencias entre estacas y miniestacas de *P. alba* con relación a la lignificación del anillo 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 (Amissah y Bassuk 2007, Amissah *et al.* 2008). En *P. alba* la etiolación, al reducir la lignificación ha incrementado el porcentaje de discontinuidades del anillo de esclerénquima y las tasas de enraizamiento, tal como fuera planteado para otras especies leñosas (Amissah y Bassuk 2007, Amissah *et al.* 2008). Borges *et al.* (2011) han observado, en 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, como se observó en este trabajo.

Con relación a las concentraciones de IBA en el porcentaje de enraizamiento de las miniestacas, no se han observado diferencias significativas, posiblemente debido al grado de juvenilidad y lignificación de estos materiales, que permitieron altas tasas de enraizamiento, independientemente de la concentración de hormonas utilizadas. Lo mismo fue observado por Araujo Vieira de Souza *et al.* (2009) en el porcentaje de enraizamiento de cedro australiano, con la utilización de la técnica de miniestacas.

Con el aumento del IBA se registró un aumento de tasas de las variables analizadas hasta un punto óptimo y posterior a éste el aumento de la dosis de IBA ocasionó una reducción de las tasas. Comportamiento similar fue observado en clones de *Eucalyptus* (Goulart *et al.* 2008). Concentraciones más elevadas de IBA también ejercieron un efecto negativo en el enraizamiento de estacas herbáceas de *P. alba* (Oberschelp y Marcó 2010).

CONCLUSIONES

Al disminuir el grado de lignificación mediante rejuvenecimiento (a través de la técnica de miniestacas) y etiolación de los propágulos utilizados para la propagación, mayores fueron las discontinuidades en el anillo de esclerenquima y mayor el grado de enraizamiento logrado en miniestacas de esta especie nativa. Lo mismo fue observado con miniestacas en relación a estacas. Esto señala la influencia del grado de lignificación en la propagación vegetativa de esta especie. Cuanto menor es el grado de lignificación mayor fue la tasa de enraizamiento.

La utilización de la técnica de miniestacas, asociada a las técnicas de etiolación empleadas posibilitaron tasas de enraizamiento viables comercialmente, se muestran promisorias para la propagación vegetativa de *P. alba* y posiblemente de otras especies nativas de difícil enraizamiento.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue subsidiado por la Universidad Nacional del Litoral a través de proyectos de Investigación CAI+D y CAI+D ORIENTADOS y por CONICET.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahkami AH, Lischewski S, Haensch KT, Porfirova S, Hofmann J, Rolletschek H, Melzer M, Franken P, Hause B, Drueg U, Hajirezaei M.R. 2009. Molecular physiology of adventitious root formation in *Petunia hybrida* cutting: involvement of wound response and primary metabolism. *New Phytologist*. 181:613-625.
- Alfenas AC, Zauza EAV, Máfia RG, Assis TF. 2009. Clonagem e doenças do eucalipto. UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 500 p.
- Amissah N, 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 DJ Jr, Bassuk N. 2008. Adventitious root formation in stem cutting of *Quercus bicolor* and *Quercus macrocarpa* and its relationship to stem anatomy. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 133:479-486.
- Araujo Vieira de Souza JC. 2015. Estudio de la Rizogénesis de *Prosopis alba* (Algarrobo blanco) Disertación (Doctorado en Ciencias Biológicas) – Universidad Nacional Del Litoral, Santa Fe, 179 p.
- Araujo Vieira de Souza JC, Barroso DG, Carneiro JGA, Teixeira SL, Balbinot E. 2009. Propagação vegetativa de cedro australiano (*Toona ciliata* M. Roemer) por miniestaquia. *Revista Árvore*. 33:205-213.
- Araujo Vieira de Souza JC, Bender, A.G., Tivano, J.C., Barroso, D.G., Mroginski, L.A., Vegetti, A.C., Felker, P. 2014. Rooting of *Prosopis alba* mini-cuttings. *New Forest* 45:745-752.
- Bastos D, Scarpore Filho JA, Tomaz ML, Rodriguez APM, Fatinansi, JC. 2005. Aspectos anatómicos e histológicos do enraizamento de estacas de caramboleira (*Averrhoa carambola* L.). *Actas Portuguesas de Horticultura* 2:55-61.

- Bennett T, Scheres B. 2010. Root development—two meristems for the price of one? *Current Topics in Developmental Biology*. 91:67-102.
- Biasi LA, Carvalho D C de, Wolf G D, Zanette F. 2002. Potencial organogênético de tecidos caulinares e radiculares de caqui. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 24:29-34.
- Borges SR, Xavier A, Oliveira LS, Melo LA, Rosado AM. 2011. Enraizamento de minietacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. *Revista Árvore*. 35:425-434.
- Caro LA, Polci PA, Lindström LI, Echenique CV, Hernández LF. 2002. Micropropagation of *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz from young and mature plants. *Biocell*. 26:25-33.
- Chaves LLB, Carneiro JGA, Barroso DG. 2006. Crescimento de mudas de angico vermelho produzidas em substrato fertilizado, constituído de resíduos agro-industriais. *Scientia Forestalis*. 72:49-56.
- D'Ambrogio de Argüeso A. 1986. Manual de técnicas en histología vegetal. Facultad de Agronomía-UBA, Ed. Hemisferio Sur, Buenos aires, Argentina. 83 p.
- De Klerk G. 2002. Rooting of microcutting: Theory and practice. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 38:415-422.
- Dias PC, Ataíde G da M, Xavier A, Oliveira LS de, Paiva HN de. 2015. Propagação vegetativa de *Schizolobium amazonicum* por estaquia. *CERNE*, 21(3), 379-386.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. 2010. InfoStat. Release 2010. FCA - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Druegge U, Kadner R, Rapaka VK, 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, Wolf S. 2005. Anatomical characters of the phyllode and stem of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don (Fabaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 15:71-76.
- Edwards RA, Thomas MB. 1980. Observations on physical barriers to root formation in cuttings. *Plant propagation*. 26:6-8.
- Elbasheer YH, Elkalifa AW. 2010. Anatomy of stem cuttings in relation to adventitious rooting of some forest trees. *University of Africa Journal of Science*. 1:62-76.
- Evert RF. 2006. *Esau's Plant Anatomy*. Wiley-Interscience, New Jersey, Estados Unidos de Norteamérica. 601 p.
- Ewens M, Felker P. 2003. The potential of mini-grafting for large scale commercial production of *Prosopis alba* clones. *Journal of Arid Environments*. 55:379-387.
- Ewens M, 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 Ecology and Management*. 260:378-383.
- Ewens M, Gezan S, 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, Ewens M, Velarde M, Medina D. 2008. Initial evaluation of *Prosopis alba* Griseb clones selected for growth at seawater salinities. *Arid Land Research and Management* 22:334-345.
- Felker P, López C, Soulier C, Ochoa J, Abdalla R, Ewens M. 2001. Genetic evaluation of *Prosopis alba* (Algarrobo) in Argentina for cloning elite trees. *Agroforestry Systems*. 53:65-76.
- Felker P, Medina D, Soulier C, Velicce G, Velarde M, 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. *Journal of Arid Environments* 61:227-247.
- Gahan PB, George EF. 2008. Adventitious regeneration. En: George, E.F., Hall, M.A. and De Kerk, G.J. (eds.). *Plant Propagation by tissue culture. The background*. Springer, Dordrecht, Países Bajos. pp. 335-401.
- Geiss G, Guttierrez L, Bellini C. 2009. Adventitious root formation: new insights and perspectives. *Annual Plant Reviews* 37:127-156.
- Goulart PB, Xavier A, Cardoso NZ. 2008. Efeito dos reguladores de crescimento AIB e ANA no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*. *Revista Arvore* 32: 1051-1058.
- Hatzilazarous S, Rifaki N, Patsou M, Kostas S, Economou AS. 2009. In vitro propagation of *Viburnum dentatum* L. var. *Lucidum* Aiton. *Propagation of Ornamental Plants*. 9:39-42.
- Hoagland DR, Arnon DI. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Experimental Station: California Agriculture*. 347 p.
- Kitomi Y, Ito H, Hobo T, Aya K, Kitano H, Inukai Y. 2011. The auxin responsive AP2/ERF transcription factor CROWN ROOT-LESS5 is involved in crown root initiation in rice through the induction of OsRR1, a type-A response regulator of cytokinin signaling. *Plant Journal*. 67:472-484.
- Koyuncu F, Balta F. 2004. Adventitious root formation in leaf bud cuttings of tea (*Camellia sinensis* L.). *Pakistan Journal of Botany* 36:763-768.
- Kraus JE, Arduin M. 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Universidade Rural, Rio de Janeiro, Brasil. 198 p.
- Kurepin L, Haslam T, López-Villalobos A, Oinam G, Yeung E. 2011. Adventitious root formation in Ornamental Plants: II. The role of plant growth regulators. *Propagation of Ornamental Plants*. 11:161-171.
- Ló SMS, Duarte MR. 2011. Morpho-anatomical study of the leaf and stem of pau-alecrim: *Holocalyx balansae*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 21:4-10.
- López-Villalobos A, Haslam T, Kurepin L, Oinam G, Yeung E. 2011. Adventitious root formation in Ornamental Plants: III. Molecular Biology. *Propagation of Ornamental Plants*. 12:75-88.
- Meng Z, Tang H, Wang D, Shao-Xiong R, Ren-Dao L. 2009. A study of rooting characteristics and anatomical structure of Feijoa cuttings. *Agricultural Journal* 4:86-90.
- Oberschelp GPJ, Marcó MA. 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.
- Oinam G, Yeung E, Kurepin L, Haslam T, López-Villalobos A. 2011. Adventitious root formation in Ornamental Plants: I. General overview and recent successes. *Propagation of Ornamental Plants*. 11:78-90.
- Peixe A, Serras M, Campos C, Zavattieri MA, Dias MAS. 2007. Estudo histológico sobre a formação de raízes adventícias em estacas caulinares de oliveira (*Olea europaea* L.). *Revista de Ciências Agrárias*. 30:476-482.
- Philipson WR, Ward JM, Butterfield BG. 1971. *The Vascular Cambium: its development and activity*. Chapman y Hall ltd., Londres. 182 p.
- Pijut PM, Woeste KE, Michler CH. 2011. Promotion of adventitious root formation of difficult-to-root hardwood tree species. *Horticultural Reviews*. 38:213-251.
- Rasband, W.S., 1997-2019. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>.
- Rasmussen A, Hunt M. 2010. Maturation delays the cellular stages of adventitious root formation in pine. *Australian Journal of Forest Research*. 73:41-46.

J. C. Araujo Vieira de Souza *et al.*

- Rasmussen A, Smith TE, Hunt MA. 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.
- Regonezi C, Klimaszewska K, Castro MR, Lima M, De Oliveira P, Zavattieri MA. 2010. Adventitious rooting of conifers: influence of physical and chemical factors. *Tree*. 24:975-992.
- Ruzin SE. 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press, New York, Estados Unidos de Norteamérica. 322 p.
- Schwarz JL, Glocke PL, Sedgley M. 2015. Adventitious root formation in *Acacia baileyana* F. Muell. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 74:561-565. DOI: 0.1080/14620316.1999.11511153.
- Silva FAS, Azevedo CAV. 2016. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *African Journal of Agricultural Research*, 11 (39): 3733-3740.
- Sorin C, Busselli JD, Camus I, Ljung K, Kowalczyk M, Geiss G, Mckhann H, Garcia C, Vaucheret H, Sandberg G, Bellini C. 2005. Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana* ARGONAUT1. *Plant Cell*. 17:1343-1359.
- Stuepp C, Zuffellato-Ribas KZ, Koehler HS, Wendling I. 2015. Rooting mini-cuttings of *Paulownia fortunei* var. *mikado* derived from clonal mini-garden. *Revista Árvore* 39 (3): 497-504.
- Verstraeten I, Beeckman T, Geelen D, Verstraeten I, Beeckman T, Geelen D. 2013. Adventitious root induction in *Arabidopsis thaliana* as a model for in vitro root organogenesis. *Methods in Molecular Biology*. 959:159-175.
- Zimmermann FJP. 2004. *Estatística aplicada à pesquisa agrícola*. Santo Antônio de Goiás, EMBRAPA Arroz e Feijão, 402 p.