

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

CARACTERIZACIÓN ANATÓMICA E HISTOLÓGICA EN ESTACAS DE
“GUAYABO DEL PAÍS” *Acca sellowiana* (Berg.) Burret DURANTE EL
PROCESO DE RIZOGÉNESIS ADVENTICIA

por

Nicolás Sergio ÁVILA TORRES
Florencia PIETRO VALDEZ

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo.

MONTEVIDEO
URUGUAY
2021

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. (Mag.) Silvia Ross

Lic. Biol. (Mag.) Mercedes Souza

Ing. Agr. Danilo Cabrera

Fecha: 29 de diciembre de 2021

Autores:

Nicolás Sergio Ávila Torres

Florencia Pietro Valdez

AGRADECIMIENTOS

A nuestros tutores Ing. Agr. (Mag.) Silvia Ross y Lic. Biol. (Mag.) Mercedes Souza por el conocimiento y el apoyo brindado, la calidez humana y paciencia.

A Danilo Cabrera y Beatriz Vignale por proporcionarnos el material vegetal para realizar la investigación.

Al Dpto. de Biol. Vegetal por proporcionarnos los materiales para realizar el trabajo de laboratorio.

Nicolás: mi agradecimiento va dirigido primeramente a mi hermana Ileana, la cual a temprana edad me mostró que existe un mundo posible fuera del pueblo y que podía acceder a él, mi referente como profesional, mi apoyo en la carrera y la vida. A mi madre Rosana, hermano Harlington y mi cuñado Gastón, por la confianza y el apoyo.

A Mara y Lili, que me demostraron amor incondicional y apoyo en el momento que más lo necesitaba.

A Sole, Nora y Juan por estar siempre y ser mi hogar.

Un especial agradecimiento a mis amigos, gracias a ellos pude transformar cada sentimiento y arrebató en enseñanzas, gracias a esos amigos que prestaron su casa, su tiempo y su amor para ayudarme a crecer y a madurar. Estos que sí creyeron en mí cuando yo ya no lo hacía.

Por último, pero no menos importante a mi amiga, compañera de carrera y tesis Flor, hermana de la vida y pilar en esas tantas horas de estudios, tantos momentos personales trascendidos.

Florencia: lo que parecía algo inalcanzable cuando comencé la carrera ha llegado a su fin. Hacer la carrera trabajando y viviendo en varias residencias no es fácil. Pero me llevo lindos recuerdos de los trabajos que tuve. Conocí personas maravillosas a lo largo de este camino con quien compartí convivencias, horas y días de estudio.

Agradezco a Favio Jamen a quien elijo todos los días como mi compañero, gracias por siempre estar ahí, apoyándome en los momentos más duros siempre estuviste ahí. ¡Este logro también es tuyo!

A mis padres, por los valores inculcados e incentivar el estudio desde pequeña. Por apoyarme en este camino, por las palabras de aliento cuando las cosas no iban bien y por la confianza.

A mis segundos padres, mis suegros que siempre me apoyaron y me dieron una palabra de aliento.

A mis amigas Ana, Katherin y Luciana quienes fueron un pilar fundamental durante lo último de la carrera, con sus palabras de aliento y confianza de que iba a llegar a recibirme. ¡Las adoro chicas!

A mi amigo incondicional y hermano de la vida que conocí en esta casa de estudios Nicolás Ávila, agradezco que esta linda carrera me diera la oportunidad de conocerte, de compartir tantas vivencias, días y noches de estudio, siendo un pilar fundamental en muchos momentos complicados. ¡Te adoro amigo!

Pero especialmente le quiero dedicar este logro a mi padre, el destino decidió que no me pudiera acompañar físicamente, pero sé que siempre estás conmigo en cada paso. Quien desde pequeña me incentivo a estudiar y delego muchos de sus sueños para que yo pudiese cumplir los míos. ¡Te adoro pa este título es tuyo también!

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. <u>OBJETIVOS</u>	2
1.1.1. <u>Objetivo general</u>	2
1.1.2. <u>Objetivos específicos</u>	2
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1. <u>Acca sellowiana</u> FRUTAL NATIVO PROMISORIO	3
2.1.1. <u>Taxonomía y distribución geográfica</u>	3
2.1.2. <u>Descripción botánica</u>	3
2.1.3. <u>Biología reproductiva y fenología</u>	4
2.1.4. <u>Características socioeconómicas y mercado</u>	4
2.2. <u>RECURSOS GENÉTICOS DE <i>Acca sellowiana</i></u>	5
2.2.1. <u>Antecedentes a nivel mundial</u>	5
2.2.2. <u>Antecedentes a nivel nacional</u>	6
2.3. <u>SISTEMAS DE PROPAGACIÓN</u>	7
2.3.1. <u>Propagación sexual</u>	7
2.3.2. <u>Propagación asexual</u>	7
2.3.2.1. <u>Acodos</u>	8
2.3.2.2. <u>Estacas</u>	9
2.3.2.3. <u>Injertos</u>	9
2.4. <u>DIFERENCIACIÓN DE RAÍCES ADVENTICIAS</u>	10
2.4.1. <u>Etapas del proceso de rizogénesis adventicia</u>	11
2.4.2. <u>Factores que influyen en la diferenciación radicular</u>	12
2.4.2.1. <u>Características del material madre</u>	12
2.4.2.2. <u>Temperatura</u>	13
2.4.2.3. <u>Efectos de las fitohormonas</u>	13

3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	16
3.1. MATERIAL VEGETAL	16
3.2. INSTALACIÓN DEL ENSAYO	16
3.3. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DE MATERIAL	17
3.3.1. <u>Preparación de muestras anatómicas</u>	17
3.3.2. <u>Observaciones al microscopio y toma de datos</u>	19
3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
4. <u>RESULTADOS</u>	25
4.1. CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN HISTOLÓGICO DE ESTACAS SEMILEÑOSAS DE <i>Acca sellowiana</i>	25
4.2. DIFERENCIAS ANATÓMICAS ENTRE GENOTIPOS CONTRASTANTES EN CAPACIDAD DE ENRAIZAMIENTO	26
4.3. EFECTO DEL TIPO DE ESTACA	28
4.3.1. <u>Interacción nudo x genotipo</u>	28
4.4. RESPUESTA A LA APLICACIÓN DE AUXINAS	30
4.5. MODIFICACIONES ANATÓMICAS EN LAS MUESTRAS A LO LARGO DEL ENSAYO	31
5. <u>DISCUSIÓN</u>	32
6. <u>CONCLUSIONES</u>	37
7. <u>RESUMEN</u>	38
8. <u>SUMMARY</u>	40
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	42

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Registro de datos de las fotos tomadas en el microscopio	20
2. Tabla con las variables analizadas en el experimento	24
3. Fuentes de variación y valores de $p < F$ del ANAVA para las variables estudiadas	26
4. Valores promedios de las variables número de anillos de tejido lignificado y espesor de anillo interno por nudo.	28
5. Efecto del AIB (12,3mM) para espesor de anillo externo y relación GAP/ Ae (%).	31
Figura No.	
1. Instalación del ensayo	17
2. Diagrama de estaca	18
3. Materiales para cortes y tinción	18
4. Diagrama de secuencia de imágenes tomadas en aumento 4X, sección transversal de tallo de <i>A. sellowiana</i>	21
5. Diagrama de secuencia de imágenes tomadas en aumento 10X, sección transversal de tallo de <i>A. sellowiana</i>	21
6. Sección transversal de tallo de <i>A. sellowiana</i> (4X)	22
7. Diagrama del experimento factorial y la combinación de sus factores	23
8. Corte transversal de estacas de tallo de <i>A. sellowiana</i> , genotipo EAN1, con tinción de floroglucinol.	25
9. Secciones transversales de corte del tallo, de dos genotipos de <i>A. sellowiana</i> con capacidad de enraizamiento contrastante, semana 1 del ensayo.	27
10. Porcentaje de muestras que presentaron uno y dos anillos de tejido lignificado para los genotipos contrastantes	27

11. Cortes transversales de tallo de <i>A. sellowiana</i> tomados en la semana 1 del ensayo (24.3) de los dos genotipos contrastantes en capacidad de enraizamiento	29
12. Espesor de anillo interno (μm) para genotipos contrastantes en capacidad de enraizamiento E y N y tres longitudes de estacas	30
13. Efecto del tiempo del ensayo, datos promedios relación GAP/ Ae (%).	31

1. INTRODUCCIÓN

Acca sellowiana (Berg.) Burret pertenece a la familia *Myrtaceae*, es un árbol o arbusto nativo del Norte del Uruguay y Sur de Brasil, que crece naturalmente en las sierras, adaptado a suelos poco profundos. Introducido para uso ornamental en el siglo XIX, fue llevado a Europa y luego multiplicado en varias regiones del mundo. En la actualidad se produce comercialmente en Colombia, Nueva Zelanda y Estados Unidos. Existen numerosas variedades de excelente calidad, originadas en programas de mejoramiento de dichos países, y a partir del 2017 aparecen los primeros cultivares de esta especie, obtenidos del trabajo conjunto entre UdelaR. Facultad de Agronomía e Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Esta especie despierta interés en los productores frutícolas nacionales por el valor económico que pueden alcanzar sus frutos y por su adaptabilidad al clima del Uruguay, lo que permite manejos agronómicos sustentables con el medio ambiente. Además, es valorada por su carácter medicinal, su fruto presenta propiedades antioxidante, antibacteriana, antiinflamatoria y como agente anti-mutagénico. Desde 1998, la Facultad de Agronomía desarrolla un programa que estudia la diversidad genética, el valor agronómico y el potencial comercial, tendiente a la selección, conservación y utilización de esta especie.

Al tratarse de una especie alógama, para la producción comercial de fruta, presenta gran variabilidad de genotipos en cultivo, obteniéndose producción con características muy heterogéneas en cuanto a productividad y calidad de frutos. Esto implica la búsqueda de genotipos superiores y así obtener frutos de calidad uniforme para su comercialización, por lo que los materiales deben ser propagados mediante reproducción vegetativa.

El estaquillado es el método de propagación más utilizado y el éxito del mismo depende de la capacidad de generar raíces adventicias. Los cultivares presentan diferencias en cuanto a su capacidad de enraizamiento, siendo este, uno de los factores que limita la expansión del cultivo a nivel nacional. Dicho proceso, a su vez, depende de factores ambientales (nutrientes, luz, temperatura, etc.) y endógenos (factores genéticos, edad del material, fitohormonas).

Este trabajo, plantea reconocer e identificar la existencia de posibles factores anatómicos que estén relacionados con la capacidad de enraizamiento en *A. sellowiana*, utilizando dos genotipos contrastantes en esta característica. A partir de los resultados obtenidos se podrá contar con información para detectar buenos materiales con óptima capacidad rizogénica. Los resultados de esta investigación serán de utilidad para comprender las actuales limitantes que existen en cuanto a la propagación vegetativa de *A. sellowiana* y poder buscar posibles soluciones a dicha problemática.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

El objetivo de este trabajo es explorar y caracterizar el patrón histológico en estacas de *A. sellowiana* durante el proceso de enraizamiento y su relación con la capacidad de diferenciar raíces adventicias en materiales contrastantes.

1.1.2. Objetivos específicos

Caracterizar el patrón histológico de las estacas semileñosas de *A. sellowiana*.

Identificar si existen diferencias anatómicas entre genotipos contrastantes en capacidad de enraizamiento.

Analizar si existen diferencias a nivel de nudo, en estacas con uno, dos o tres nudos por debajo del meristema apical, según genotipo y entre los genotipos contrastantes.

Observar y analizar modificaciones anatómicas en las muestras a lo largo del tiempo.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Acca sellowiana* FRUTAL NATIVO PROMISORIO

2.1.1. Taxonomía y distribución geográfica

El guayabo del país (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) pertenece al orden Myrtales, familia Myrtaceae, subfamilia Mirtoideae, tribu Myrteae, género *Acca* Berg (Lucas et al., 2019). Es un arbusto frutal conocido en Uruguay como Guayabo del país, Guayabo o Guayabera serrana y en Brasil como Goiaba-Serrana, Goiaba-do-Mato, Goiaba-da-Serra o Feijoa (Rivas et al., 2007).

Esta especie se describe como una planta subtropical, cuya distribución natural se ubica en la región austro brasileña, desde el Suroeste del estado brasileiro de Paraná hasta el Sur de Río Grande del Sur y mitad Norte del Uruguay (Legrand 1968, Mattos 1986, Ducroquet et al. 2000, Thorp y Bieleski 2002). Legrand (1968) establece como distribución natural de las mirtáceas en Uruguay una zona de rica influencia (Artigas, Rivera, Tacuarembó, Cerro Largo y Treinta y Tres) y otra zona de baja influencia (Maldonado, Rocha y Lavalleja). Puppo (2008) define que la especie se distribuye naturalmente en la zona de gran influencia y es allí donde se han prospectado las poblaciones naturales en Uruguay. Según Grela (2004), esta especie se encuentra incluida en la flora Oriental, integrada en gran parte por especies paranaenses, ubicadas al Noreste de Uruguay.

2.1.2. Descripción botánica

Acca sellowiana es un arbusto o pequeño árbol de follaje perenne, de tronco tortuoso con corteza escamosa de color castaño rojiza; en Uruguay mide de 2 a 4 metros de altura y llega a 8 metros en Brasil (Puppo, 2008). Las hojas son simples, opuestas, pecioladas, de lámina sub coriácea y ovada, pudiendo variar entre oval oblongas y obovadas de 4 a 8 cm de largo, verde oscuro en el haz, blanco-tomentosas en el envés, nerviación pinnada, con pocos pares de nervaduras secundarias, ápice agudo hasta obtuso, margen entero, revoluto, base amplia y aguda (Legrand, 1996).

Las flores son hermafroditas, se desarrollan en la axila de las hojas de las ramillas del año. Su estructura floral se compone de un cáliz con cuatro sépalos desiguales y la corola conformada por cuatro pétalos carnosos, de forma ovada y profundamente recurvados, color rojizo por dentro y blanco-ceroso por fuera, muy vistosos y comestibles. Los estambres son erectos, color violeta, culminan en anteras ovadas, color amarillo, se encuentran presentes en un

número de 60 a 90, el estilo es violeta, glabro y el estigma capitado. La distancia sobre el plano de las anteras es variable pudiendo llegar hasta los 15 mm. El ovario es ínfero y adherente, de 6 a 8 mm, con 4 lóculos, multiovular, óvulos anátropos (Popenoe 1912, Legrand 1968, Mattos 1969, Ducroquet et al. 2000).

El fruto es una baya de forma redonda a oblonga, de 3 a 8 cm. de largo, piel rugosa a lisa, color verde a verde amarillo, coronado por el cáliz persistente; cáscara de 4 a 12 mm de espesor, derivada del receptáculo o hipantio, dura o blanda, con aglomeraciones esclerosas. Pulpa gelatinosa de color crema, comestible, de sabor dulce acidulado y aroma característico. Semillas pequeñas y numerosas, reniformes, albuminosas, embrión en espiral, cotiledones foliáceos, raicilla larga (Popenoe 1912, Legrand 1968, Mattos 1969, Ducroquet et al. 2000, Thorp y Bielecki 2002, Fischer et al. 2003, Puppo 2008).

2.1.3. Biología reproductiva y fenología

A. sellowiana es una especie predominantemente alógama. La flor es hermafrodita, con tendencia a la dicogamia por protoginia, siendo que el estigma se torna receptivo 24 horas antes que la dehiscencia de las anteras, pero aún mantiene su receptividad por 10 horas durante la liberación de polen. También hay evidencia de otras barreras fisiológicas como la autoincompatibilidad tardía, que en algunas variedades llega a ser completa. La arquitectura floral impone barreras físicas a la autopolinización, se sugiere a las aves como potenciales polinizadores más que al viento y los insectos (Ducroquet et al. 2000, Santos et al. 2005).

En Uruguay, el período de floración se extiende de octubre hasta fines de noviembre (Vignale y Bisio, 2005). El desarrollo del fruto oscila entre 120 a 150 días, durante los primeros 40 días presenta un desarrollo lento y termina con un climaterio. Los frutos muestran normalmente una curva de crecimiento sigmoideal simple, pero según el cultivar y las condiciones agroecológicas puede ser doble sigmoideal (Fischer et al., 2003). La cosecha se extiende desde fines de febrero hasta mediados de mayo, dependiendo del origen del material (Vignale y Bisio, 2005).

2.1.4. Características socioeconómicas y mercado

Este frutal nativo, es apreciado por los productores locales donde se desarrolla en forma natural, siendo su consumo fresco su principal aporte alimenticio. Su atractivo como planta ornamental lo posiciona dentro de los árboles históricamente utilizados en parques y jardines. En la medicina popular,

se revalorizó recientemente por su acción contra la gastroenteritis (Rivas et al., 2007).

Su comercialización tanto en fresco como procesado es incipiente en Uruguay, observándose en los últimos años un aumento en ferias vecinales y supermercados. Las partidas han sido limitadas y aunque se observa en otoño un incremento en oferta y demanda, esta última está insatisfecha en la actualidad (Rivas et al., 2007).

2.2. RECURSOS GENÉTICOS DE *Acca sellowiana*

2.2.1. Antecedentes a nivel mundial

Según Thorp y Bieleski (2002) el primer país occidental en donde el guayabo fue seleccionado y cultivado fue Francia. Sin embargo, no tuvo éxito en su producción y desarrollo comercial. En Italia en la Universidad de Nápoles se instaló una colección en Portici y a partir de dicho material se realizaron varias selecciones, Portici S, Portici W, Portici X y Portici Y. En España se destacan tres cultivares: Alpe, Castroviejo y Vilgarcia, con buena adaptación climática y producción, sin embargo, el tamaño del fruto es pequeño para ser comercializado. Los autores definen a Coolidge como el primer cultivar de guayabo seleccionado en California, posteriormente se da la aparición de dos cultivares más, Chociana y Superba. Estos fueron los elegidos por muchos años como progenitores de selecciones en otros países, el cultivar Coolidge, se destacó por ser autofértil y productivo.

Nueva Zelanda se ha destacado por el lanzamiento de cultivares con buenas características comerciales, entre ellas se destacan productividad y tamaño de fruta, que, bajo condiciones adecuadas de polinización, pesaban 100 g, llegando a 250 g, como Apollo (autofértil), Gemini y más recientemente Opal Star, Pounamu y Kakapo. En Colombia los cultivares seleccionados mostraron gran productividad sin embargo el tamaño del fruto es pequeño destacándose Rionegro (65 g), Tibarosa (40 g) y Niza (22 g, Ducroquet et al., 2000). En Brasil el guayabo ha sido investigado desde 1986, por la Empresa de Investigación Agropecuaria y Extensión Rural de Santa Catarina SA (EPAGRI), con el objetivo de seleccionar genotipos superiores y desarrollar un sistema que permita su producción a escala comercial, dando como resultado el lanzamiento de cuatro cultivares en 2007 y 2008: Alcántara, Helena, Mattos y Nonante (Ducroquet et al. 2000, Dos Santos et al. 2011).

2.2.2. Antecedentes a nivel nacional

La apuesta al desarrollo del cultivo de guayabo en Uruguay se justifica por el éxito de la especie en otros lugares del mundo, la necesidad de diversificar la oferta de fruta, las cualidades nutricionales de la misma y la amplia gama de destinos a los que se ajusta (Rivas et al., 2007).

Desde 1998, la Facultad de Agronomía en Uruguay, desarrolla un programa que estudia la diversidad genética, el valor agronómico y el potencial comercial, tendiente a la selección, conservación y utilización de especies pertenecientes a la familia de las *Myrtaceae* identificadas como promisorias por su valor y potencial agronómico (Vignale y Bisio, 2005). En el año 2000 se inició en Uruguay el programa de Selección de Frutas Nativas con interés comercial, realizado por Facultad de Agronomía (UdelaR. Fagro) y el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Dirección General Forestal (MGAP), contando con dos jardines de Introducción (UdelaR. Facultad de Agronomía. Estación Experimental “San Antonio” en Salto e INIA Las Brujas, estación experimental “Wilson Ferreira Aldunate”, Canelones), donde se caracterizan y evalúan. Los objetivos principales del programa de selección son la liberación de cultivares comerciales adaptados a Uruguay para impulsar el desarrollo comercial de este recurso nativo (Vignale y Bisio, 2005). Como resultado se han identificado varios materiales genéticos que producen fruta de buen sabor, tamaño, nivel de producción y calidad de fruta, con fechas de cosecha que se extienden desde principios de marzo a fines de mayo (Vignale et al., 2012).

En 2008, se realizaron 22 hibridaciones dirigidas con el objetivo de obtener fruta de buen tamaño y calidad. Estos cruzamientos se realizaron en la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía en Salto y parte de los plantines generados fueron también cultivados, en INIA Las Brujas e INIA Salto Grande. Como resultado, algunos cruzamientos presentaron fruta con buenas características comerciales (Vignale et al., 2012).

En 2011 un estudio en la zona de Maldonado (en un espacio público) en una población silvestre sub-espontánea de guayabo presentó la particularidad de tener la pulpa color rosada, característica desconocida hasta el momento para esta especie. Tanto a nivel nacional como mundial se realizaron estudios con poblaciones de pulpa blanca, hasta el momento no se había caracterizado ni evaluado una población o individuos que posean pulpa de color rosado (Cruz et al., 2012).

Los resultados obtenidos a nivel nacional, muestran la existencia de un germoplasma con gran valor para la aplicación de esquemas de mejoramiento

genético. El uso de herramientas biotecnológicas que impulsen estos eventuales programas de mejoramiento permitiría reducir los costos y tiempo en la obtención de cultivares adaptados a las condiciones locales (Quezada, 2011). A partir de estos estudios se podría dar respuesta a las problemáticas planteadas por técnicos y productores, siendo la gran variabilidad genética, en capacidad de enraizamiento, producción, calidad de fruta, las principales características que limitarían la producción comercial en Uruguay, en caso de no propagarse la especie de forma asexual ó vegetativa. ¹

Los estudios genéticos en guayabo son escasos en Uruguay. Esta especie presenta ventajas como ser diploide con un número cromosómico $2n=22$ y tener un genoma pequeño (245 Mpb/1C; da Costa et al., 2008), que facilitan tanto el estudio de genética clásica, como análisis más modernos que involucran la caracterización de todo el genoma). El guayabo es una especie predominantemente alógama por lo que no se dispone de líneas endocriadas. La propagación vegetativa es posible pero aún no se dispone de técnicas eficientes y aplicables a cualquier genotipo (Pritsch et al., 2015).

2.3. SISTEMAS DE PROPAGACIÓN

2.3.1. Propagación sexual

La propagación por semilla es uno de los métodos de reproducción de las plantas en la naturaleza, utilizado de manera muy eficiente en plantas cultivadas. Este tipo de propagación permite obtener gran variabilidad genética, lo que posibilita la adaptación continua de las especies a posibles cambios en el ambiente. Sin embargo, a nivel comercial se busca que las características que han sido seleccionadas se perpetúen en la siguiente generación (Hartmann y Kester, 1998). Este método presenta ciertos inconvenientes como ser: alta variabilidad, producción tardía y procesos de alternancia observados en algunos cultivares (Fischer et al., 2003). En referencia al guayabo, su fruto posee aproximadamente 70 semillas con un porcentaje de germinación del 95%, su propagación comercial no es recomendada por ser una especie alógama, siendo la propagación asexual la más utilizada por mantener las características varietales seleccionadas (Campos, 1993).

2.3.2. Propagación asexual

En fruticultura la clonación toma vital importancia debido a que la mayoría de las plantas frutales presentan un genotipo altamente heterocigoto,

¹ Cabrera D. 2018. Com personal.

perdiéndose las características únicas de estas plantas al propagarse por semilla (Hartmann y Kester, 1998). La propagación asexual, vegetativa o clonal implica que cada una de las plantas que se producen a partir de la planta madre y presentan las mismas características genotípicas, la regeneración vegetativa tiene particular importancia en las habilidades relacionadas con los sistemas de propagación (Fischer et al., 2003). Este tipo de propagación ocurre debido a la habilidad de totipotencia inherente a las células vegetales, permitiendo regenerar la planta entera, ya que cuenta con la información genética necesaria para replicar las características específicas de cualquier planta individual, dando origen a un clon de la planta madre (Fachinello et al., 1992).

Si bien la propagación vegetativa no es más económica que la propagación por semilla, su empleo se justifica por la superioridad y uniformidad de los clones específicos y la eliminación de la fase juvenil, acortando así, el tiempo para llegar a la madurez reproductiva (Hartmann y Kester, 1998). Según Thorp y Bielecki (2002), esta técnica de propagación en guayabo presenta en los resultados muy variables en lo que respecta a capacidad de enraizamiento.

2.3.2.1. Acodos

Este método de propagación, permite la formación de raíces adventicias en un tallo que está todavía adherido a la planta madre, de la cual continúa recibiendo agua y minerales, al generar sus propias raíces adquiere la capacidad de ser separada de esta (Hartmann y Kester 1998, Fisher et al. 2003).

El guayabo se puede propagar por acodo subterráneo o aéreo. El acodo subterráneo consiste en bajar un gajo o rama de diámetro reducido a un surco abierto del lado de la planta madre, donde debe quedar fijo y seguro por ganchos o agarres, dejando la tierra en contacto con éste para que las yemas de su parte superior vayan brotando. En cuanto a la preparación de las plantas, son desenterradas las ramas enraizadas separándolas con las raíces correspondientes, formando plántulas nuevas (Fachinello y Nachtigal, 1992). La formación de raíces en los acodos, depende del suministro frecuente de humedad, aireación, luz y temperatura moderada (Perea Dallos et al., 2010). Estudios realizados por Salvarrey (2008) muestran que el guayabo responde al estímulo de la poda invernal siendo el acodo subterráneo un método eficaz, si bien, no se ha determinado claramente los factores que lo determinan. Concluyendo, además, que este sistema de propagación tiene grandes requerimientos de agua y fertilización para obtener buenos resultados. Por otro lado, el acodo aéreo es un método muy trabajoso y raramente utilizado, aunque útil si la planta presenta ramas situadas en una copa alta para asegurar las buenas cualidades del cultivar (Mattos, 1986).

2.3.2.2. Estacas

El método de estaquillado consiste en obtener segmentos de una parte del tallo, ramas, raíz u hoja de la planta madre, expuesto a condiciones ambientales favorables para formar un sistema de raíces y un nuevo sistema caulinar. El enraizamiento de las estacas depende de múltiples factores, como la edad de la planta madre, condición fisiológica y estado nutricional de esta, el potencial genético, la época de cosecha y el tipo de estaca, así como la concentración endógena y exógena de reguladores de crecimiento (Fischer et al., 2003).

Hartmann y Kester (1998), señalan que las estacas de tallo o de raíz tomadas en la fase de desarrollo juvenil del crecimiento, con frecuencia forman nuevas raíces con mayor facilidad que aquellas tomadas de plántulas que están en fase adulta de su desarrollo. Salvarrey (2008), al evaluar técnicas de propagación vegetativa en Guayabo, concluye que un bajo porcentaje de enraizamiento (0,2%), estaría determinado por la utilización de material madre de tejido maduro, demostrando además que existe un efecto genotipo independientemente del tratamiento. Estudios realizados en propagación de peral por Sampaio y Barbin (1983) refieren que, en materiales de difícil enraizamiento, es recomendable utilizar estacas herbáceas y condiciones de nebulización. Los autores mencionan como un factor decisivo en el enraizamiento, la aplicación de nebulización, manteniendo la humedad de las hojas, y así disminuir la presión de vapor de las mismas, reduciendo la temperatura y tasa de respiración. Por consiguiente, permite mantener las hojas funcionales por largos períodos de tiempo.

El estaquillado en otoño y primavera son los métodos que han dado mayores resultados en *A. sellowiana*. Éstos varían dependiendo del material genético y del tipo de estaca utilizada. La oxidación de los tejidos ha sido el mayor inconveniente para la obtención de buenos resultados en la propagación vegetativa de guayabo (Cabrera et al., 2010). Este método es el más eficiente especialmente cuando no se dispone de porta-injertos que tengan alguna ventaja en términos de precocidad, porte de las plantas, tamaño de los frutos, o resistencia a plagas y enfermedades del suelo (Ducroquet et al., 2000).

2.3.2.3. Injertos

Hartmann y Kester (1998) definen al patrón (pie, masto o porta injerto) como la parte inferior del injerto que se desarrolla y forma el sistema radical de la planta injertada, este puede originarse de semilla, de una estaca enraizada o de una planta acodada. La púa del cultivar se une con el patrón para formar la porción superior de injerto de la cual crece el tallo y las ramas. Esta porción de la

planta debe ser del cultivar deseado y estar libre de enfermedades. El injerto de yema es similar al injerto común, excepto que la púa se reduce en tamaño y contiene una sola yema.

Los injertos más utilizados en guayabo, son el de púa terminal y el de parche, yema o escudete. El injerto de púa terminal debe realizarse en edades tempranas del patrón para que los mismos sean viables, cuando el grosor del tallo es inferior a 4 mm. En el caso del injerto de parche debe removerse por completo un parche rectangular de corteza del patrón, el cual se sustituye por uno del mismo tamaño de la planta a injertar, presentando brotaciones inferiores al 60%. El injerto de púa debe tomarse de tejidos de desarrollo intermedio de la planta madre, coincidiendo con el diámetro del patrón, este método mostró prendimientos superiores al 80% entre 30 a 45 días después de realizado el injerto (Fischer et al., 2003).

2.4. DIFERENCIACIÓN DE RAÍCES ADVENTICIAS

Las raíces adventicias son aquellas que se originan a partir de tejidos no radicales como tallos u hojas (Da Rocha Correa et al., 2012). Este tipo de raíces se producen de forma natural, en respuesta a estímulos externos, generalmente estrés abiótico ya sea por daño mecánico o incluso por regeneración de algún tejido (Bellini et al., 2014). El origen de las raíces adventicias en estacas, se localiza en un amplio rango de tejidos, siendo el xilema secundario joven el más importante, pudiendo originarse también de otros tejidos, como son los radios vasculares, el cambium, el floema, las lenticelas o la médula (Hartmann y Kester, 1998)

Hartmann y Kester (1998), señalan que las raíces adventicias pueden ser de dos tipos: raíces preformadas o raíces de lesiones. Las raíces preformadas se desarrollan naturalmente, estando adheridas a la planta madre, pero no emergen hasta después de cortar una sección de tallo. Las raíces de lesiones se desarrollan después de realizar el corte al preparar la estaca. En este proceso las células son lesionadas y quedan expuestas sobre la superficie cortada las células muertas y conductoras del xilema. Posteriormente ocurre el proceso de cicatrización y regeneración que consta de 3 etapas: primero, la formación de una placa necrótica que sella la herida de un material suberoso (suberina) y tapa el xilema con goma evitando así la desecación; segundo, las células comienzan a dividirse y se forma una capa de células del parénquima (callo) y, por último, en algunas células cercanas al cambium vascular y al floema se empiezan a diferenciar raíces adventicias.

Hartmann y Kester (1998), dividen en cuatro etapas los cambios anatómicos que pueden observarse en el tallo durante la iniciación de raíces:

1. Desdiferenciación de las células maduras específicas.
2. Formación de iniciales de raíz en ciertas células cercanas a los haces vasculares, las cuales se han vuelto meristemáticas por la desdiferenciación.
3. Desarrollo subsecuente de éstas iniciales de raíz, en primordios de raíces organizados.
4. Desarrollo de emergencia de estos primordios radicales hacia afuera, a través del tejido del tallo, formación de conexiones vasculares entre los primordios radicales y los tejidos conductores de la propia estaca.

2.4.1. Fases del proceso de rizogénesis adventicia

Varios autores coinciden en que el proceso de formación de raíces adventicias consiste en tres etapas fisiológicas sucesivas, cada una con requerimientos específicos: inducción, iniciación y expresión (Gaspar et al. 1992, Kevers et al. 1997, De Klerk et al. 1999, Pacurar et al. 2014, Porfirio et al. 2016). Los meristemas de raíz se generan a partir del proceso de desdiferenciación celular, en el cual, las células predeterminadas cambian su ruta morfogénica actuando como células madre (De Klerk et al. 1999, De Klerk 2002, Li et al. 2009).

1. **Fase de inducción**, ocurren eventos bioquímicos y sin modificaciones histológicas visibles antes de las primeras divisiones celulares y ciertas células adquieren competencia, obteniendo la capacidad para responder a señales químicas-metabólicas.
2. **Fase de iniciación**, a partir del estímulo de la auxina, las células se vuelven determinadas, siendo capaces de captar y reactivar la división celular para formar el primordio radical.
3. **Fase de expresión**, se caracteriza por un crecimiento dentro del tallo del primordio radical a través de la corteza dando lugar a la emergencia de la raíz y el establecimiento de conexiones vasculares de la nueva raíz con el tallo. En esta etapa no necesariamente ocurren una señal endógena, siendo la auxina un regulador negativo.

Las últimas dos fases son las que determinan la fase de formación de raíces. Cada una de estas fases tienen requerimientos específicos y conocer sus características resulta importante para la adecuada manipulación en esta etapa de desarrollo (Fett-Neto et al., 2001).

2.4.2. Factores que influyen en la diferenciación radicular

El desarrollo de la planta está regulado por factores genéticos y ambientales, estos tienen efectos en la síntesis de auxinas, su metabolismo, transporte y respuesta frente a alguna señal (Pop et al., 2011). Factores como la temperatura y hormonas (principalmente auxinas), actúan como señales que inducen a grupos celulares que redefinen su orientación a la formación de raíces adventicias. Las hormonas desempeñan roles complejos, ya sea ejerciendo efectos directos como la división celular o crecimiento celular, o indirectos mediante la interacción con otras moléculas o fitohormonas (Li et al., 2009).

2.4.2.1. Características del material madre

La planta madre se define como la unidad biológica debidamente identificada y caracterizada, a partir de esta se obtienen semillas o estructuras vegetativas con el fin de iniciar procesos de propagación (Fischer et al., 2003). El cambio de fase juvenil a adulta no es un cambio abrupto, ocurre de manera gradual, donde las características típicas de la primera fase se pierden en forma progresiva, se ve afectada la capacidad de enraizamiento variando según la especie. No es un factor meramente genético, sino que epigenético, causado por la expresión diferencial de genes o la activación o represión de estos, dando como resultado la formación de células o tejidos con diferentes atributos (Beyl y Trigiano, 2015).

A nivel productivo la edad del material es importante, por estar relacionado con la eficiencia del cultivo y con la selección de cultivares mejorados (Hackett 1987, Beyl y Trigiano 2015). La pérdida de capacidad de enraizamiento es uno de los factores económicamente más relevantes en especies leñosas (forestales, frutales u ornamentales) condicionando la propagación clonal en los genotipos superiores. Diversos autores manifiestan que la pérdida de la capacidad de regeneración potencial de raíces adventicias, en especies forestales se debe al uso de materiales de edad avanzada (Hartmann y Kester 1998, Husen y Pal 2007, Bellini et al. 2014).

En trabajos realizados por Rasmussen et al. (2015) con plantas de *Pisum sativum*, observaron que la pérdida de la capacidad de generar raíces adventicias, puede relacionarse con un cambio ontogénico de la fase vegetativa

a reproductiva (formación de meristemas florales) dado por la competencia de recursos. La reducción en la formación de raíces adventicias se encuentra vinculada con señales que controlan el pasaje a estado reproductivo y no por una señal o competencia por los recursos producidos por las plantas.

2.4.2.2. Temperatura

La temperatura puede modificar la capacidad de enraizamiento adventicio en muchos aspectos, desde la absorción de agua y nutrientes hasta el metabolismo en general, inhibiendo o promoviendo diversas acciones enzimáticas. Se ha observado que estos efectos pueden influir en el estado fisiológico de la planta madre, con un efecto directo durante la etapa de enraizamiento adventicio (Geiss et al., 2009).

El aumento en densidad y largo de raíces puede verse favorecido por cambio de temperaturas contrastantes. Este tipo de respuesta es una característica común entre las respuestas al estrés, y hay varios casos relacionados con el enraizamiento adventicio, como estrés por inundación, en el que varias alteraciones morfológicas se activan, así como la emisión de raíces adventicias (Bray et al., 2000).

El cambio abrupto de temperatura en el ambiente del ensayo, realizado en estacas de *E. saligna* y *E. globulus*, mostró un aumento en enraizamiento, pudiendo estar dado por un aumento endógeno de auxina. El rango de temperaturas óptimas varía de acuerdo a cada especie y la aplicación exógena de auxinas provoca un mayor desarrollo radical en condiciones de temperaturas extremas, obteniendo mejores respuestas. En ambas especies las estacas tardaron más para enraizar a bajas temperaturas, aumentando su velocidad de desarrollo al aumentar esta. A efectos individuales, se pudo ver que temperaturas más altas, especialmente en la fase de formación, promovió una mayor densidad y elongación de la raíz, un efecto evidente tanto en la presencia como en la ausencia de IBA durante inducción (Correa y Fett-Neto, 2004).

2.4.2.3. Efectos de las fitohormonas

El desarrollo y crecimiento de las plantas se encuentra regulado por características genéticas, factores ambientales y hormonales. Las hormonas vegetales (fitohormonas) que afectan la rizogénesis se pueden clasificar en: auxinas, citoquininas, etileno y giberelinas. Las fitohormonas pueden ser tanto endógenas si son sintetizadas por la planta, como exógenas si son suministradas externamente (Beyl y Trigiano, 2015). Desempeñan funciones complejas, que ejercen efectos directos (que actúan sobre la división celular o el crecimiento

celular) o indirectos (que interactúan con otras moléculas o fitohormonas, Wiesman et al., 1988). La aplicación de auxinas cumple un rol fundamental en especies de difícil enraizamiento, es una práctica viable y decisiva para la formación de raíces debido a que permite no sólo promover la rizogénesis sino también adelantar el proceso, incrementar el número y la calidad de las raíces, y proporcionar mayor uniformidad de enraizamiento (Hartmann y Kester, 1998).

Las auxinas fueron las primeras hormonas descubiertas en plantas y forman parte de una extensa lista de agentes químicos que regulan el desarrollo vegetal. La forma más común de auxina natural es el ácido indol-3-acético (IAA). La biosíntesis de IAA en una planta está asociada a los tejidos en rápido crecimiento y división, especialmente en brotes, aunque todos los tejidos vegetales tienen la capacidad de producirla en bajas cantidades. La raíz principal se inhibe a concentraciones de auxina superiores a 10^{-8} M, sin embargo, la formación de raíces laterales (o ramificación) y las raíces adventicias se estimulan con niveles elevados de la hormona. Las raíces laterales se encuentran normalmente sobre la zona de elongación. Las auxinas estimulan la división de estas células formando gradualmente el ápice de la raíz, creciendo a través del córtex y la epidermis (Taiz y Zeiger, 2002).

La respuesta del guayabo al enraizamiento de estacas tratadas con auxinas es variada, dependiendo del tipo de estacas y la forma de aplicación del regulador del crecimiento (Fischer et al., 2003). En referencia a lo antes expuesto Fachinello (1992), expone que la aplicación exógena de AIB genera respuestas muy diferentes en guayabo. Se observó un efecto positivo a la aplicación y tiempo de exposición a esta hormona. Cabrera et al. (2010) a partir de un estudio realizado en estacas semileñosas de guayabo, obtuvieron a diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (AIB, 0 y 2000 ppm) una respuesta muy variable de enraizamiento, dependiente del genotipo.

Las citoquininas fueron descubiertas investigando factores que estimulan la división celular vegetal, afectando esta hormona a muchos procesos fisiológicos y de desarrollo. Se concentran en las células jóvenes que se dividen rápidamente, meristemas apicales de tallo y raíces. Cuando la proporción de auxinas es mayor a la de citoquininas, se estimula la formación de raíces, la relación inversa da lugar a la formación de tallos (Taiz y Zeiger, 2002). Por otro lado, las citoquininas en muy bajas concentraciones son requeridas en los primeros estados de iniciación de rizogénesis adventicia debido a su efecto promotor en la división celular (Hartmann y Kester 1998, Beyl y Trigiano 2015).

El etileno (C₂H₄) es un gas incoloro, su síntesis endógena está directamente vinculada con la promoción o inhibición de raíces adventicias, la biosíntesis de etileno y auxinas comparten algunas vías. Se demostró que el

etileno también está involucrado en la inducción de nuevos primordios de raíz en girasol inundado (Beyl y Trigiano, 2015). Altas concentraciones de auxinas pueden desencadenar el proceso de síntesis de etileno. Esta hormona regula el transporte y señalización de las auxinas, actuando en forma tanto antagónica como sinérgica en el desarrollo radical (Hartmann y Kester, 1998). Las plantas que han crecido en presencia de inhibidores de etileno, así como mutaciones insensibles al etileno, tienen una formación de pelos radiculares reducida, actuando este como regulador positivo en la diferenciación de los pelos radicales (Taiz y Zeiger, 2002).

Las giberelinas, son un grupo de hormonas que se encuentran fundamentalmente bajo la forma de ácido giberelico (GA), siendo la GA₃ la más utilizada a nivel comercial (Hartmann y Kester 1998, Beyl y Trigiano 2015). Esta hormona inhibe la biosíntesis de auxinas, sin embargo, el nivel de auxinas aumenta la concentración de GA, promoviendo la transcripción de sus cofactores. De esta forma la yema apical promueve el crecimiento, no sólo a través de la síntesis directa de auxinas, sino también a través de la biosíntesis de GA1 (Taiz y Zeiger, 2002).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

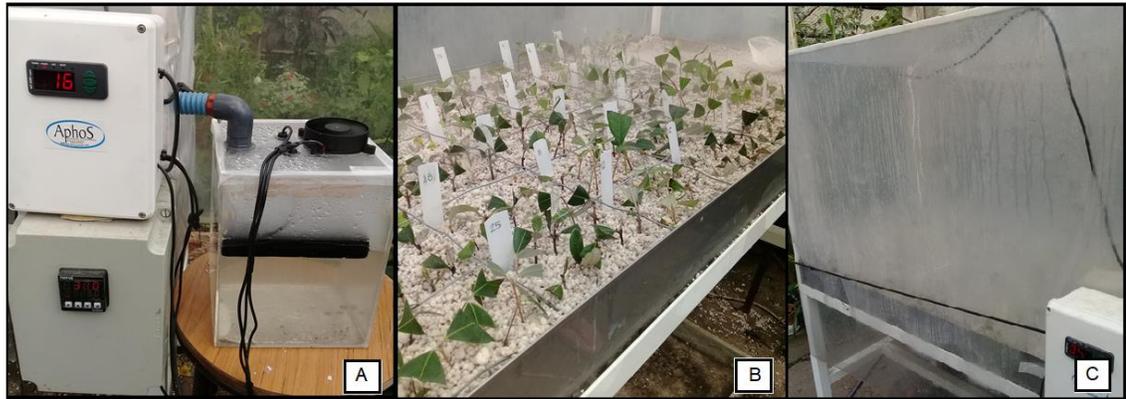
El material vegetal fue suministrado por el Programa de Selección de Frutas Nativas con potencial comercial, desarrollado en forma conjunta por la Facultad de Agronomía, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). Entre los materiales preseleccionados en el marco de dicho programa, se eligen dos genotipos contrastantes en capacidad de enraizamiento de las estacas previamente identificadas como TF (difícil de enraizar) y C74 (fácil de enraizar). A continuación, se describen brevemente sus principales atributos.

El genotipo TF proviene de la localidad de Laureles, departamento de Tacuarembó. La planta madre se obtuvo de semilla, su vigor es medio y medianamente productiva. La fruta es de buen sabor, 13°Brix, de forma oblonga, cáscara gruesa y tamaño medio a chico. Presenta baja capacidad de enraizamiento de las estacas (inferior a 20%, Ross et al., 2015). Este genotipo se identifica como N (no enraíza) tanto en el diseño experimental como en el documento.

El genotipo C74 proviene de una planta de semilla, ubicada en el departamento de Salto. Esta presenta vigor medio a alto, medianamente productiva a poco productiva. La fruta es de muy buen sabor, 14,5 ° Brix, forma redondeada a oblonga, cáscara media a fina y tamaño medio a grande. Este genotipo se caracteriza por tener muy buena capacidad de enraizamiento (mayor a 60%, Ross et al., 2015). El mismo se identifica tanto en el diseño experimental como en el resto del documento como E (enraíza).

3.2. INSTALACIÓN DEL ENSAYO

El ensayo se realizó en el invernáculo de UdelaR. Facultad de Agronomía, en marzo de 2017 y tuvo una duración de dos meses. El mismo se instaló sobre una cama caliente con control de temperatura (25 ± 2 °C) y humedad (80%) proveniente a partir de un sistema de niebla intermitente durante todo el experimento. Se empleó perlita como sustrato y se aisló con polietileno (Figura 1).



A: instrumentos de regulación de temperatura y humedad.

B: instalación del ensayo sobre cama caliente.

C: aislación del ensayo con polietileno para mantener humedad y temperatura.

Figura 1. Instalación del ensayo

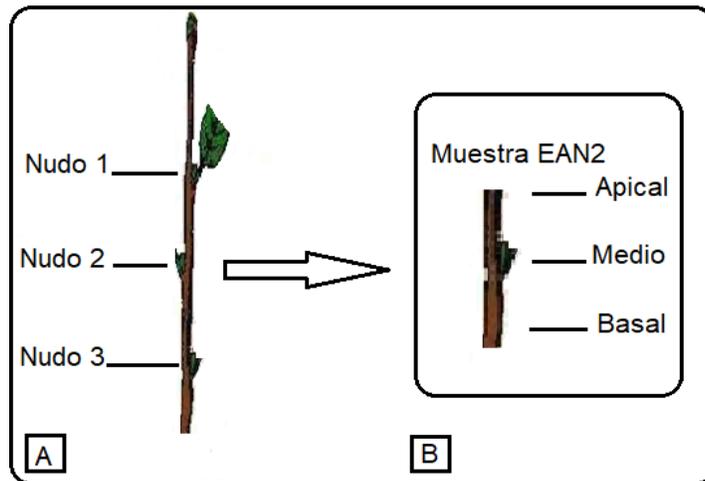
Se cortaron estacas de ramas basales de las plantas madre de los genotipos seleccionados, denominados previamente, enraíza (E) y no enraíza (N), usando tres tamaños de estaca, según el número de nudos presente: uno, dos y tres nudos, por debajo del meristema apical (N1, N2 y N3, Figura 2A). Se colocaron a enraizar 180 estacas de cada genotipo, se aplicó IBA a la mitad de las muestras sumergiendo la base de estas durante 5 segundos en una solución no estéril de IBA 12,3 mM (Sigma I5386, Sigma-Aldrich) para inducir el enraizamiento. Semanalmente se evaluó la presencia o ausencia de raíces en la totalidad de estacas, extrayéndose dos por parcela, al azar, almacenadas para su posterior análisis anatómico.

3.3. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DE MATERIAL

3.3.1. Preparación de muestras anatómicas

Se tomó muestras de estacas de $1 \pm 0,1$ cm de longitud, para facilitar la penetración del fijador y comodidad de manipulación de los cortes. Se fijó en una solución de formol, ácido acético, etanol al 70% (FAA, 5:5:90) por 48 horas y posteriormente se almaceno en etanol 70%.

Para observar las características anatómicas de las estacas, se realizó cortes transversales de tallo. Se definió tres zonas de corte con respecto al nudo: apical, medio y basal, para poder evaluar la variación de los patrones histológicos en la misma (Figura 2B), de cada zona se seleccionó las tres mejores muestras.

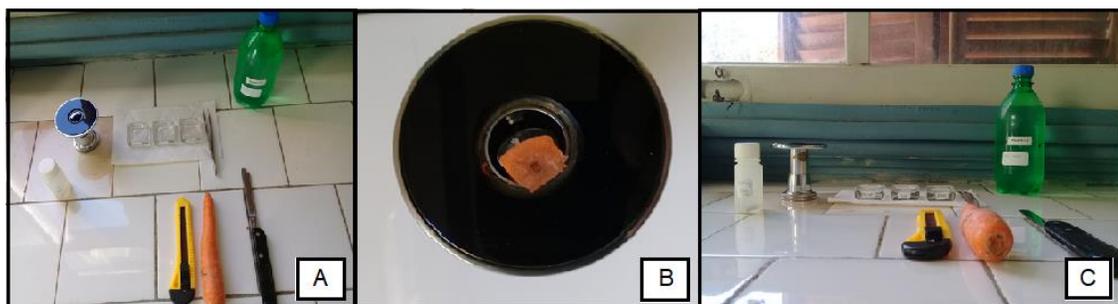


A: estaca con tres nudos.

B: ilustración de muestra y zonas de corte respecto al nudo, ejemplo EAN2 genotipo enraiza, con auxina, nudo 2.

Figura 2. Diagrama de estaca

Los cortes se realizaron en serie, con un micrótopo manual, de grosor 12-15 μm utilizando una cuchilla descartable (Figura 3A). Para mantener la estaca inmóvil al momento de hacer el corte, se empleó un trozo de zanahoria permitiendo un corte limpio (Figura 3B), con la precaución que la estaca quede bien fijada. Al momento de colocar la zanahoria para el corte, se tomó en cuenta que el extremo apical de la muestra se encuentre orientado hacia arriba, de modo de realizar los cortes de forma ordenada. Luego fueron sumergidos en etanol 70% hasta su posterior proceso de tinción.



A: instrumental utilizado para realizar los cortes.

B: vista superior del micrótopo donde se observa la zanahoria y estaca ya ubicada para el corte.

C: instrumental para tinción, floroglucinol, HCl, portaobjetos, cubreobjetos, recipiente con etanol 70%.

Figura 3. Materiales para cortes y tinción

Las secciones transversales obtenidas en los cortes, se montaron en portaobjetos y se tiñeron con floroglucionol, con un tiempo de espera de 2 a 3 minutos (Figura 3C), se flameó el portaobjetos para fijar la tinción, por último, se aplicó HCl al 25% dejándolo actuar por 3 minutos (D'Ambrogio de Argüeso, 1986). De esta manera, mediante la detección citoquímica de lignina con floroglucionol, se pueden observar las células lignificadas en color rojo, entre ellas, los vasos xilemáticos y células del esclerénquima (D'Ambrogio de Argüeso, 1986).

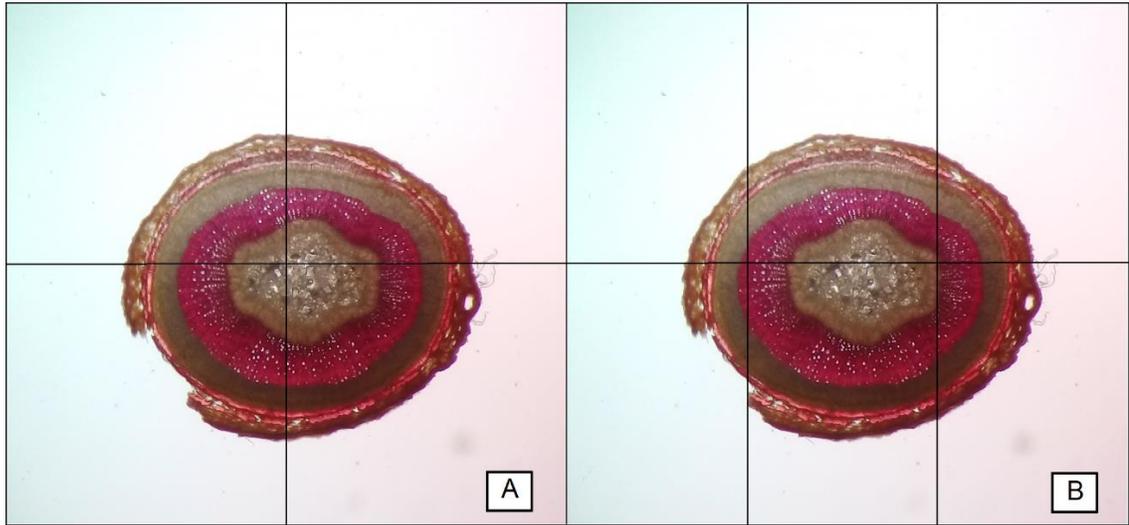
3.3.2. Observaciones al microscopio y toma de datos

Para observar el desarrollo y diferenciación del esclerénquima, así como las variaciones en grosor de las células y su distribución, se analizó las imágenes obtenidas de las secciones transversales, usando el microscopio Nikon E100, la cámara digital Dino Eye 2.0 y el programa Dino Capture 1.5.27. Se observó todos los cortes realizados, seleccionando los tres en mejores condiciones por cada zona, registrándose las anotaciones en la planilla Excel (Cuadro 1).

Cuadro 1. Registro de datos de las fotos tomadas en el microscopio

Fecha:												
Anotador: Florencia/Nicolás												
Sección	Apical	C1	C2	C3	Media	C1	C2	C3	Basal	C1	C2	C3
1. Código de cada corte	EAN17-4											
2. Antecedentes en preparación (anormalidades)	Detalle				Detalle				Detalle			
2.1. Dureza	Alta/ media/ baja				Alta/ media/ baja				Alta/ media/ baja			
2.2. Cristalización	si/ no				si/ no				si/ no			
2.3. Burbujas en el preparado	si/ no				si/ no				si/ no			
2.4. Anormalidades en muestra (quemado, seco, deshidratación)	si/ no				si/ no				si/ no			
2.5. Otras anormalidades	si/ no				si/ no				si/ no			
3. Calidad de tinción	Mala/ buena/ muy buena				Mala/ buena/ muy buena				Mala/ buena/ muy buena			
4. Calidad y cantidad de cortes	No. y detalle				No. y detalle				No. y detalle			
5. Fibras												
5.1. Presencia-ausencia	si/ no				si/ no				si/ no			
5.2. Distribución (continua,	Cont/ disc.				Cont/ disc.				Cont/ disc.			
5.3. No. de capas	No.				No.				No.			
5.4 Presencia y No. de GAPS	No.				No.				No.			
6. Diferenciación de primordios	si/ no				si/ no				si/ no			
7. Diferenciación celular	si/ no				si/ no				si/ no			
8. Presencia de canales secretores (esquizogenos-lisigenos)	No.				No.				No.			
9. Presencia de células con cristales (drusas)	si/ no				si/ no				si/ no			

Se realizó una toma de fotografías sistematizada, a modo de captar, en los diferentes aumentos, los detalles para cada muestra estudiada. En el aumento 4X se tomaron de 4 a 6 fotos (Figura 4) obteniendo así, una vista panorámica del corte. En el aumento 10X se tomaron 2 secuencias de fotografías (Figura 5) a lo largo de dos radios de corte (perpendiculares entre sí) para cubrir todas las regiones del tallo. El aumento 40X se utilizó para observar en detalle características a destacar como ser, fibras de esclerénquima, células del tejido parenquimático, entre otras.



A: vista panorámica de cortes en cuatro fotos.

B: vista panorámica de cortes en seis fotos.

Figura 4. Diagrama de secuencia de imágenes tomadas en aumento 4X, sección transversal de tallo de *A. sellowiana*

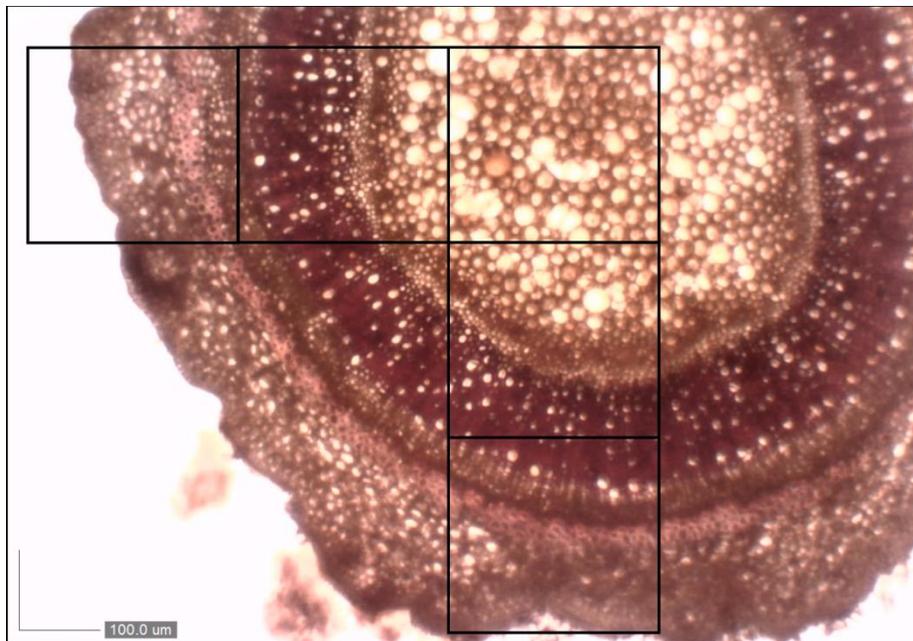
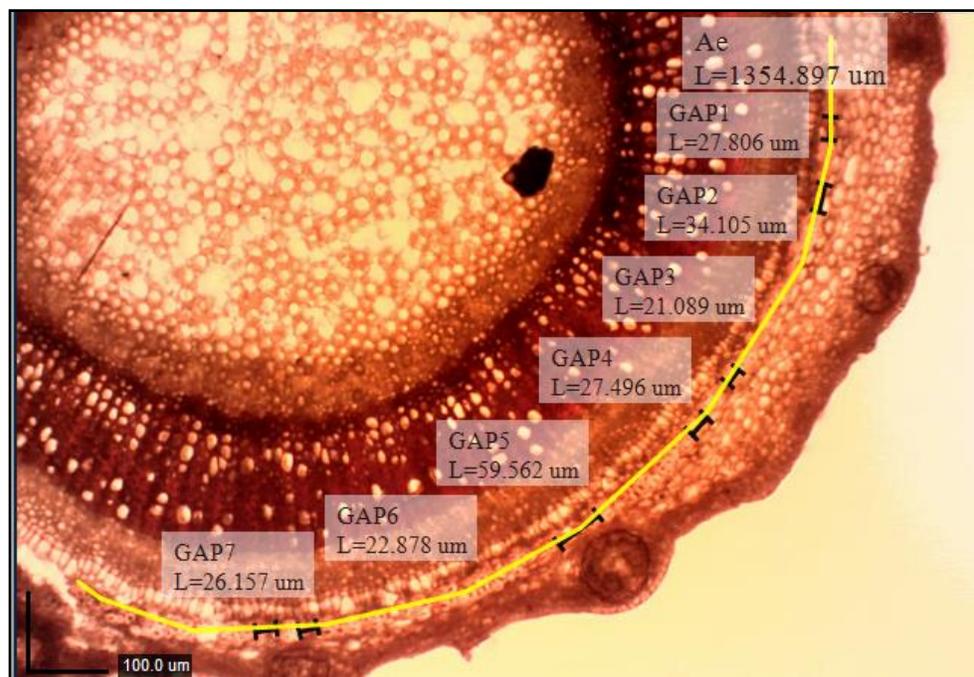


Figura 5. Diagrama de secuencia de imágenes tomadas en aumento 10X, sección transversal de tallo de *A. sellowiana*

A partir de las fotografías tomadas de la sección transversal, se registraron datos como ancho: número y continuidad de los anillos lignificados perifloemáticos. La discontinuidad observada en la vaina del anillo de esclerenquima (GAP) se utilizó para calcular el porcentaje libre de fibra, expresado como la relación existente entre los GAP y la continuidad de fibras observadas en el anillo externo (Amisshah et al., 2008), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{porcentaje libre de fibra: } \Sigma \text{ Gap/longitud del arco anillo externo.}$$

Esta variable se midió a partir de un arco trazado en la totalidad de la sección del anillo, obteniendo así su longitud total, sobre el que se cuantifican los GAP observados en el tramo (Figura 6). Registrando, además, el número de células de espesor del anillo. En caso de presentar un anillo interno de células lignificadas se midió su longitud y espesor en micras.



Se observan las brechas parenquimatosas (GAP1, GAP2, etc. barras negras) y el anillo de tejido lignificado externo (Ae: línea amarilla).

Figura 6. Sección transversal de tallo de *A. sellowiana*

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se definió el diseño experimental factorial 2x2x3, completamente aleatorizado, con tres repeticiones (Figura 7). Los factores fueron los siguientes: dos genotipos (E y N), dos niveles de IBA (0 y 12,3 mM) simbolizados como SA y A respectivamente y tres tamaños de estaca (N1, N2 y N3). El diseño experimental se representa de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + \text{tratamiento } i + \text{genotipo } j + \text{semana } k + \text{nudo } l + E_{ijkl}$$

Donde,

Y: variable dependiente.

μ : media general.

E: error experimental.

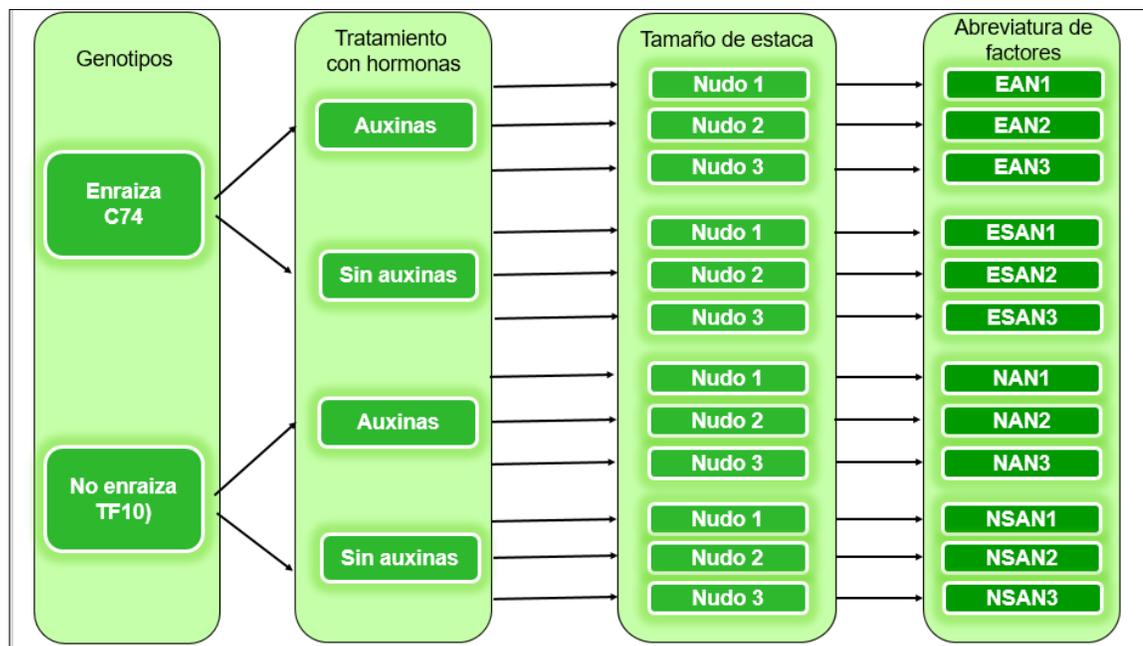


Figura 7. Diagrama del experimento factorial y la combinación de sus factores

La unidad experimental se define como el conjunto de 10 estacas del mismo genotipo y número de nudos, expuestas al mismo tratamiento. De cada unidad experimental, se realizaron tres repeticiones quedando definido el ensayo por 36 unidades experimentales.

A partir de los datos obtenidos en las mediciones utilizando el software Dino Capture 1.5.27.A (Electronic Corp.) se elaboró un cuadro para procesar los datos y realizar el análisis estadístico (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tabla con las variables analizadas en el experimento

Genotipo	Tratamiento	Semana	Nudo	No. de anillos de tejido lignificado	Espesor de anillo interno (micras)	Espesor de anillo externo (No. de células)	Porcentaje libre de fibra

Las variables independientes definidas fueron las siguientes: genotipo, tratamiento, semana y nudo.

Se definieron como variables dependientes: anillos de tejido lignificado, espesor de anillo interno (micras), espesor de anillo externo (número de células) y separación de anillo lignificado (%): relación Gap/anillo externo.

Registro de las variables dependientes:

- **Anillos de tejido lignificado:** se cuantificó el número de anillos de tejido lignificado en las fotos de aumento 4X, los valores obtenidos para esta variable fueron 1 ó 2 anillos.
- **Espesor de anillo interno:** se midió en el software Dino Capture 1.5.27.A, el valor se obtuvo promediando tres mediciones en el aumento de 10X.
- **Espesor de anillo externo:** se contabilizó el número de células que conforman el anillo, los valores obtenidos van de 0 a 7 células.
- **Porcentaje libre de fibra:** se calculó en el aumento 4X, en el software Dino Capture 1.5.27.A, obteniendo así, la relación entre la medida de los GAP y la longitud del anillo externo de esclerénquima.

Para realizar el análisis estadístico el software utilizado fue InfoStat (Di Rienzo, 2008). Para comprobar la existencia o no de diferencias significativas entre los distintos factores a evaluar se realizó un análisis de varianza (ANAVA). En aquellos casos donde se constató al menos una diferencia, se realizó el test de Tukey con un nivel de significancia de 0,05 ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN HISTOLÓGICO DE ESTACAS SEMILEÑOSAS DE *Acca sellowiana*

En los cortes transversales realizados en estacas para ambos genotipos se observó una estructura anatómica similar (Figura 8). La epidermis uniestratificada con pelos simples cubre la superficie del tallo, debajo la corteza está conformada mayormente por células parenquimáticas, con presencia de cavidades secretoras. El cilindro vascular está rodeado por un anillo externo discontinuo de fibras de esclerénquima. A continuación, en el cilindro vascular se distinguen los tejidos secundarios xilema, floema y floema interno. El parénquima medular presenta cristales y drusas de tamaño variable. Los cortes realizados en la zona apical y basal tienen forma circular y en la zona media presentan forma ovalada debido a las trazas foliares. No hubo modificación respecto a su forma en los diferentes tamaños de estaca (N1, N2, N3).



Referencias: Ae= anillo externo (indicado por punta de flecha), Cs= cavidades secretoras, Cv= cambium vascular (indicado por punta de flecha), Ep= epidermis, F= floema, Fi= floema interno M= médula, X= xilema. Barra de escala: 50 µm.

Figura 8. Corte transversal de estacas de tallo de *A. sellowiana*, genotipo EAN1, con tinción de floroglucinol

El análisis estadístico de los datos obtenidos después del procesamiento de imágenes de estacas de tallo de *A. sellowiana* (Cuadro 3), mostró que los diferentes genotipos (E y N) tienen un número significativamente diferente de anillos y de espesor de anillo externo e interno. A partir de la aplicación del tratamiento con auxinas, se observan diferencias significativas para las variables espesor de anillo externo y la relación GAP/ Ae. La longitud de estaca afectó el número de anillos y espesor de anillo interno. Las variables analizadas presentaron diferencias significativas según la semana del ensayo.

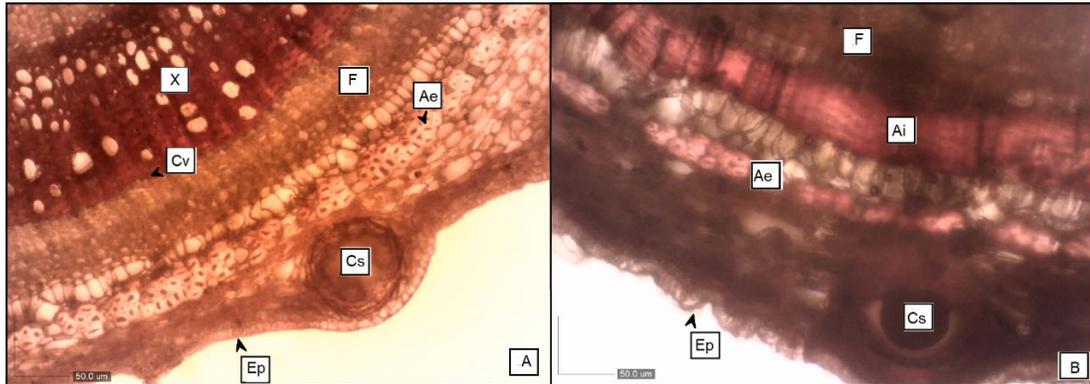
Cuadro 3. Fuentes de variación y valores de $p < F$ del ANAVA para las variables estudiadas

Fuente de variación	Valor p			
	No. de anillos de tejido lignificado	Eai (μm)	GAP/ Ae (%)	Eae (No. cel)
Genotipo	<0,0001	<0,0001	0,8345	<0,0001
Tratamiento	0,438	0,0079	<0,0001	<0,0001
Nudo	<0,0001	<0,0001	0,2743	0,0093
Semana	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Genotipo x nudo	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Eae= Espesor de anillo externo de tejido lignificado, Eai (Micras)= Espesor de anillo interno de tejido lignificado en micras, GAP/ Ae= Relación brecha parenquimatosa en anillo externo/ anillo externo. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

4.2. DIFERENCIAS ANATÓMICAS ENTRE GENOTIPOS CONTRASTANTES EN CAPACIDAD DE ENRAIZAMIENTO

La estructura anatómica del genotipo enraíza (E) y del genotipo no enraíza (N) son semejantes en sección transversal. El genotipo E muestra un anillo en la parte externa del floema (Ae), conformado por células de tamaño irregular, forma circular y paredes engrosadas (Figura 9A). El genotipo N difiere del anterior por tener además del anillo externo, un anillo interno formado por una capa celular ubicada inmediatamente debajo de las fibras del floema (Ai). Las células de esta capa presentan paredes ligeramente más gruesas que las otras células floemáticas, forma rectangular, tamaño uniforme y están ordenadas de modo compacto (Figura 9B).



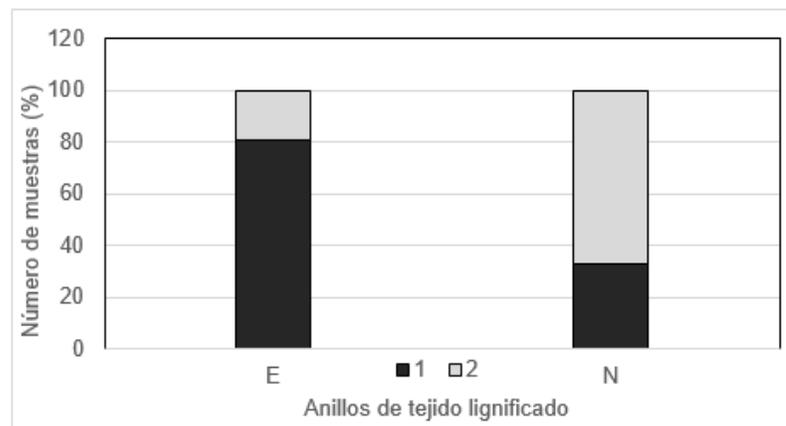
A: genotipo N= difícil enraizamiento.

B: genotipo E= fácil enraizamiento.

Referencias: A= anillo externo (indicado por punta de flecha), Ai= anillo externo (indicado por punta de flecha) Cs= cavidades secretoras, Cv= cambium vascular (indicado por punta de flecha), Ep= epidermis, F= floema, X= xilema. Barra de escala= 50 µm.

Figura 9. Secciones transversales de corte del tallo, de dos genotipos de *A. sellowiana* con capacidad de enraizamiento contrastante, semana 1 del ensayo

El análisis estadístico de los datos procesados, mostró que el número de anillos con células lignificadas varió significativamente entre los genotipos. En el genotipo N las muestras con dos anillos representaron el 67% de los cortes, en caso contrario el genotipo E tan solo presentó el 19% (Figura 10).



E: fácil de enraizar.

N: difícil de enraizar.

Figura 10. Porcentaje de muestras que presentaron uno y dos anillos de tejido lignificado para los genotipos contrastantes

Las células del anillo interno presentaron paredes ligeramente más gruesas y de mayor tamaño que las otras células floemáticas, acentuándose esta característica en el genotipo N con un espesor en el rango de 8,12 a 71,79 μm , valores contrastantes al genotipo E en el que se contabilizaron espesores menores, de 4,52 a 27,03 μm , confirmándose con ANAVA las diferencias significativas.

4.3. EFECTO DEL TIPO DE ESTACA

Se compararon diferentes tamaños de estacas, considerando el nudo apical más uno, dos o tres nudos por debajo de este. Las estacas de diferente tamaño presentaron diferencias para las variables número de anillos de tejido lignificado y espesor del anillo interno. Se obtuvo como resultado que el número de anillos de tejido lignificado y espesor del anillo interno aumenta hacia el tercer nudo, obteniéndose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para las 3 longitudes de estacas y un aumento en espesor desde 8,68 a 17,19 μm hacia el nudo 3 (Cuadro 4).

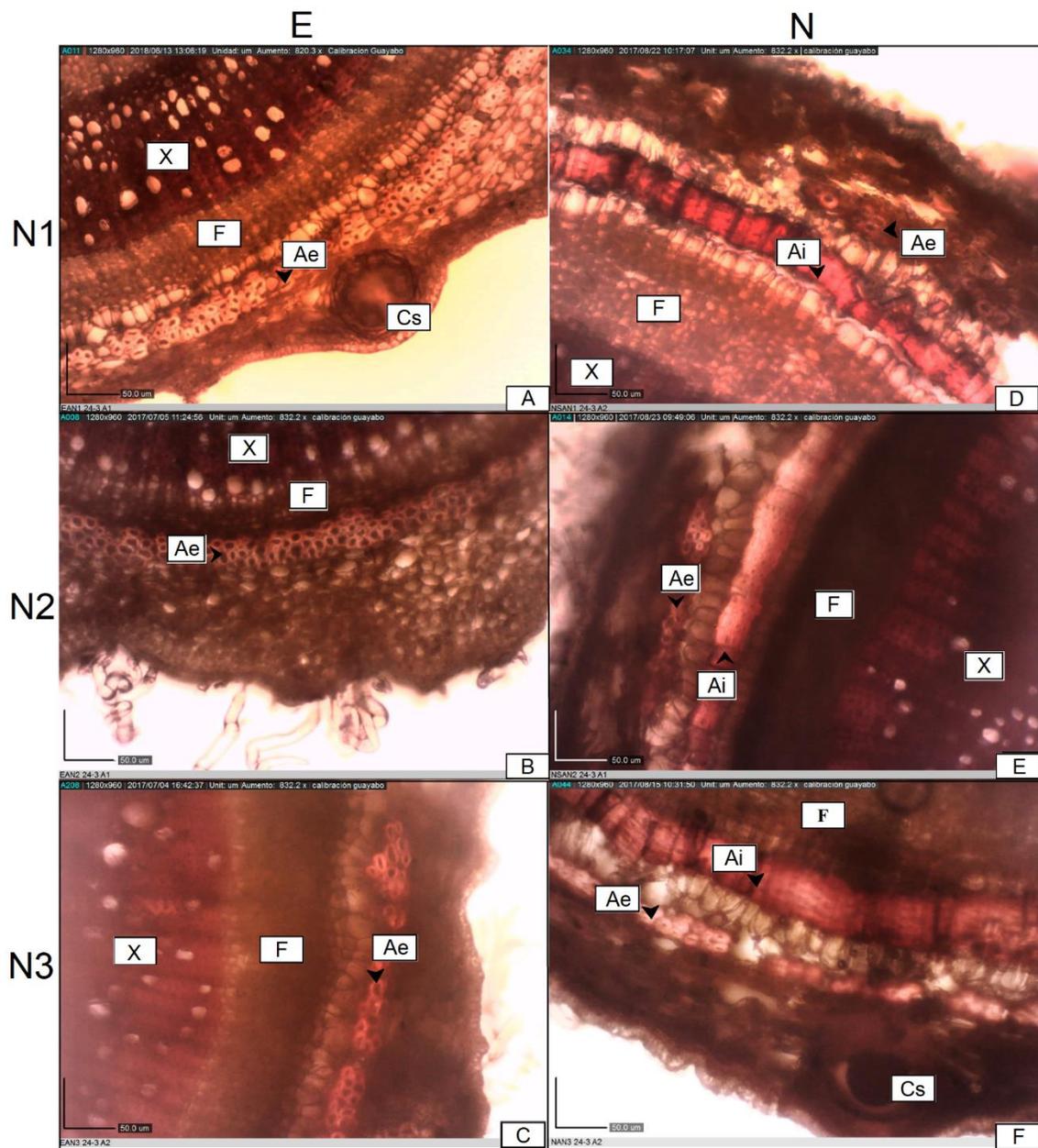
Cuadro 4. Valores promedios de las variables número de anillos de tejido lignificado y espesor de anillo interno por nudo

Fuente de variación	No. de anillos de tejido lignificado	Eai (μm)
Nudo 1	1,31 a	8,68 a
Nudo 2	1,39 b	13,32 b
Nudo 3	1,53 c	17,29 c

No. anillos de tejido lignificado, EAi (μm)= espesor de anillo interno en micras. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

4.3.1. Interacción nudo x genotipo

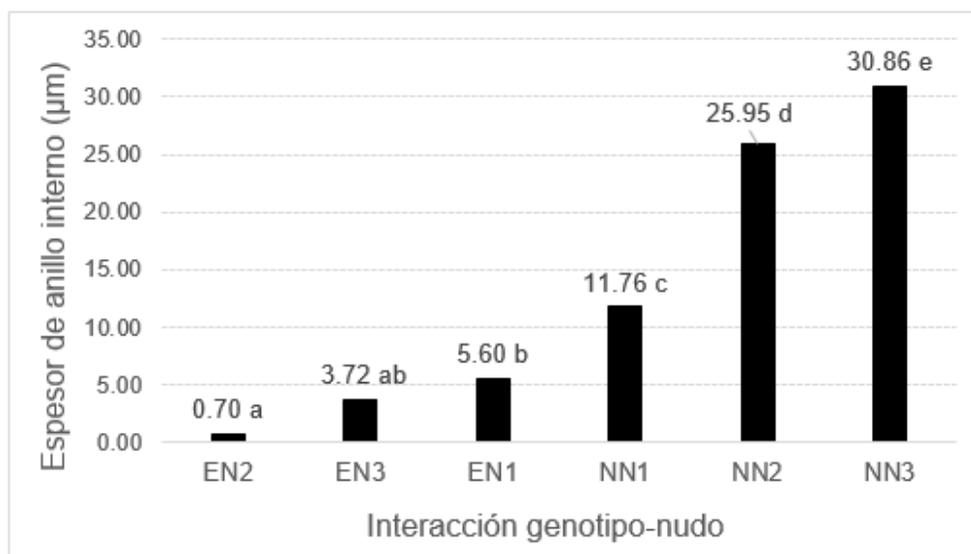
Al analizar las secciones transversales de la semana uno se observó el mismo patrón histológico descrito anteriormente. La presencia de células con paredes engrosadas formando anillo discontinuo de tejido lignificado se presentó en ambos genotipos (Ae, Figura 11A y 11B). Se encontraron diferencias entre los genotipos al aumentar el tamaño de estaca. En el genotipo N se observó la diferenciación de un tejido ubicado a continuación de las fibras del floema formando un anillo continuo con las características anatómicas ya descritas (Ai, Figura 11B, punta de flecha negra). Este anillo está siempre presente en el genotipo N a partir del primer nudo (Figura 11D), al analizar los cortes desde el nudo uno a tres se encontró evidencia que este aumenta el espesor a medida que aumenta el tamaño de estaca (Figura 11D, 11E y 11F).



E (izquierda) y N (derecha), para las 3 longitudes de estacas N1, N2, N3. A y B nudo 1, apical C y D, nudo 2, medio. E y F, nudo 3 basal. Referencias: Ae= anillo externo (indicado por punta de flecha), Ai= anillo interno (indicado por punta de flecha) Cs= cavidades secretoras, F= floema, X= xilema. Barra de escala= 50 μm.

Figura 11. Cortes transversales de tallo de *A. sellowiana* tomados en la semana 1 del ensayo (24.3) de los dos genotipos contrastantes en capacidad de enraizamiento

El análisis estadístico de los datos obtenidos posterior al procesamiento de las imágenes para todas las semanas del ensayo mostró que existe interacción genotipo nudo para la variable espesor de anillo interno. Se observa que el genotipo E presenta menor espesor de anillo interno con respecto al genotipo N. El genotipo N aumenta el espesor pasando de 11,76 a 30,86 μm a medida que aumenta la longitud de la estaca (Figura 12).



Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

Figura 12. Espesor de anillo interno (μm) para genotipos contrastantes en capacidad de enraizamiento E y N y tres longitudes de estacas

4.4. RESPUESTA A LA APLICACIÓN DE AUXINAS

La aplicación exógena de auxinas tuvo un efecto significativo en el espesor de anillo externo, se observó un incremento en el número promedio de células pasando de 2,13 a 2,41. Las brechas parenquimatosas presentes en el anillo externo GAP/Ae (%) aumentaron con la aplicación del tratamiento pasando de un 44 a 55 % (Cuadro 5).

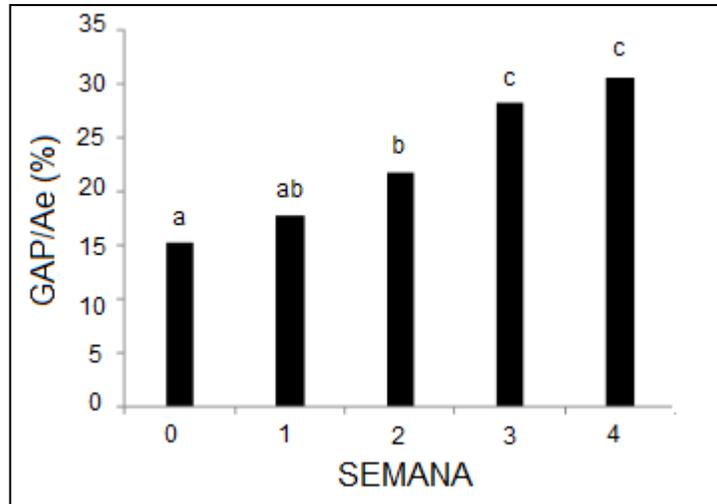
Cuadro 5. Efecto del AIB (12,3mM) para espesor de anillo externo y relación GAP/ Ae (%)

Tratamiento	Eae (No. de células)	GAP/ Ae (%)
Sin auxinas	2,13 a	44 a
Auxinas	2,41 b	55 b

Eae= Espesor de anillo externo (No. de células). GAP/ Ae= Relación brecha parenquimatosa en anillo externo/ anillo externo. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

4.5. MODIFICACIONES ANATÓMICAS EN LAS MUESTRAS A LO LARGO DEL ENSAYO

Todas las variables analizadas durante las semanas del ensayo (número de anillos de tejido lignificado, espesor de anillo interno, relación GAP/ Ae y espesor de anillo externo) presentaron diferencias significativas. Sin embargo, la única que muestra una tendencia definida en los datos es la relación GAP/ Ae, aumentando de manera significativa con el tiempo, incrementándose de 15% a 30%, esta diferencia se acentúa a partir de la semana 3 (Figura 13).



Testigo: 0= Semana instalación del ensayo. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

Figura 13. Efecto del tiempo del ensayo, datos promedios relación GAP/ Ae (%)

5. DISCUSIÓN

Este estudio representa el primer trabajo a nivel nacional de caracterización anatómica de tallo de *A. sellowiana*. Si bien hay otros trabajos realizados en esta especie (Scaltritti 2016, Vanzini 2016, Urraburu 2017), ninguno se ha enfocado en las características anatómicas vegetativas. Al momento de realizar esta investigación una de las interrogantes planteadas fue buscar una explicación para las diferencias observadas en genotipos contrastantes para capacidad de enraizamiento. A partir de los resultados obtenidos se encontraron diferencias en las características anatómicas de éstos que contribuyen al conocimiento de la especie y a explicar las limitantes en cuanto a su propagación.

En los dos genotipos estudiados se observan características propias de la familia Myrtaceae (Metcalf, 1950). En la periferia del tallo, en la zona sub-epidérmica se encontró la presencia de cavidades esquizógenas, estudios realizados por Cortadi et al. (1996) señalan la evidencia de estas estructuras en las especies *Eugenia uniflora* y *Myrcianthes pungens*. Asimismo, Metcalf (1950) detalla la presencia de éstas en otros géneros de la misma familia como por ejemplo *Callistemon*, *Darwinia*, *Eucalyptus*, *Leptospermum*, *Melaleuca* y *Myrtus* (Ciccarelli et al., 2003). El sistema vascular está rodeado por un anillo externo discontinuo de fibras perifloemáticas, presente en ambos genotipos. Esto también fue observado en *Blepharocalyx salicifolius*, *Myrcianthes pungens* y *Eugenia uniflora* donde la estructura primaria de tallo está rodeada por un anillo discontinuo de fibras perifloemáticas (Cortadi et al., 1996). El parénquima medular presenta cristales, según Metcalf (1950) estos cristales son drusas de oxalato de calcio que se pueden encontrar tanto solitarias como agrupadas, a menudo en abundancia, en el tejido no lignificado en especies de *Callistemon*, *Eucalyptus* y *Melaleuca*. Según Van Vliet y Baas (1984), los cristales prismáticos, a menudo grandes, incluidos en idioblastos, son una ocurrencia común en algunas especies de Myrtaceae.

Al estudiar la anatomía en esquejes de *A. sellowiana* Zhang et al. (2009) observaron múltiples capas de células de esclerénquima cerca del floema como una de las principales razones de formación deficiente de raíces en esta especie. La presencia de esclerénquima o fibras perifloemáticas en una variedad de especies se ha relacionado con bajos porcentajes de enraizamiento, incluyendo *Quercus macrocarpa* (Amisshah et al., 2008), varias especies de *Eucalyptus* y *Corymbia* (Goulart et al. 2014, Wendling et al. 2014, Bryant y Trueman 2015), *Juglans nigra* (Stevens y Pijut, 2017). Beakbane (1961) encontró que el enraizamiento era inversamente proporcional al porcentaje de fibras y a la integridad del anillo esclerénquima en pera (*Pyrus communis* L), haya (*Fagus sylvatica* L) y portainjertos de manzana (*Malus* Mill).

Por el contrario, Davies et al. (1982), Hartmann y Kester (1998), concluyeron que no existe una relación causal directa entre la esclerificación y la capacidad de enraizamiento reducida, ya que las raíces adventicias pueden emerger a través de roturas en el esclerénquima que se forman durante el crecimiento de la raíz o tallo, y los esquejes de especies difíciles de enraizar a menudo no logran formar primordios radiculares independientemente de su desarrollo de esclerénquima. Aunque en algunos casos una envoltura de tejido lignificado puede actuar como barrera mecánica para la emergencia de las raíces, existen tantas excepciones a ello que ciertamente no puede ser la causa primaria de la dificultad de enraizamiento (Hartmann y Kester, 1998).

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que la presencia de este anillo externo discontinuo de fibras perifloemáticas, presente en ambos genotipos, es poco probable que constituya una barrera física que impida el enraizamiento al no encontrarse diferencias estadísticas significativas según genotipo y a nivel anatómico.

Se observó que los genotipos E y N de *A. sellowiana* difieren anatómicamente. La principal diferencia está dada por la presencia de un anillo interno de tejido multiestratificado lignificado que se desarrolló entre el floema y el anillo externo discontinuo de fibras perifloemáticas, este anillo interno se desarrolló principalmente en el genotipo N y su grosor aumentó desde el nudo uno al tres. El tejido observado presenta varias capas continuas de células prismáticas de pared gruesa que se disponen de manera compacta, sin espacios intercelulares. El patrón antes mencionado se corresponde con el desarrollo de la peridermis durante el crecimiento secundario de tallo de varias especies leñosas (Esau, 1985).

Estudios realizados en cortes transversales de tallo con crecimiento secundario de *Blepharocalyx salicifolius*, mostraron que el felógeno o cambium suberoso, meristemo que da origen a la peridermis, se inicia tempranamente, originándose a partir de divisiones periclinales en los estratos internos de la corteza (Cortadi et al., 1996). Soffiatti y Angyalossy-Alfonso (1999), utilizan las características de la peridermis, así como la presencia o ausencia de formación de ritidoma, como características diagnósticas para diferenciar anatómicamente dos especies de *Eugenesia* L, Myrtacea. La presencia de peridermis se evidenció en estudios anatómicos de tallos de *Eugenia puniceifolia* (Da Silva et al., 2020) y *Eugenia pyriformis* (Armstrong et al., 2011). Mayer et al. (2008) a partir de un estudio realizado en estacas de dos especies de *Calliandra* (*C. brevipes* y *C. tweedii*) concluyen que la dificultad de enraizamiento observada puede ser atribuida a la presencia de peridermis. La peridermis observada en este trabajo, presente mayoritariamente en el genotipo N, podría ser un indicador de cambio de fase temprano de juvenil a maduro que se debería tener en cuenta en la propagación de materiales maduros, ya que genera una pérdida de competencia

para formar raíces. Reconocer este tipo de tejidos antes de propagar especies promisorias sería una herramienta muy útil para descartar genotipos con problemas de enraizamiento.

El potencial de enraizamiento puede estar relacionado con la anatomía del tallo, ya que los esquejes blandos a menudo proporcionan un enraizamiento más alto que los esquejes semifirmes o lignificados (Perry y Trueman 1999, Pijut et al. 2011). En consecuencia, la posición dentro de un brote de donde se cosechan los explantes o esquejes puede influir fuertemente en su capacidad de enraizamiento y vigor adventicio (Husen y Pal 2007, Abu-Abied et al. 2012). Zhang et al. (2009) mencionan la madurez del material madre como un factor que estaría afectando la capacidad de generar raíces adventicias en estacas de *A. sellowiana*, estando influenciado estrechamente por la madurez fisiológica. Así mismo, estudios realizados por Rincón y Suárez, citados por Fischer et al. (2003) en estacas de diferentes edades de *A. sellowiana*, observaron que el enraizamiento muestra mejores resultados en diámetros entre 0,8 y 1,08 cm, con respecto al número, diámetro y longitud de raíces, comparados con diámetros mayores. Estas variaciones se explican desde el punto de vista anatómico, ya que los paquetes de ritidoma formados en estaquillas semileñosas, no están tan separados por el tejido suberizado como en las estaquillas leñosas, permitiendo la emisión de raíces de manera inmediata y en gran número. White y Lovell (1984) observaron en estaquillas de material madre maduro una mayor lignificación y la presencia de un anillo continuo de esclerénquima que podría actuar como una limitante para la formación de raíces. En este estudio compararon estaquillas de *Corymbia torelliana* y *Corymbia citriodora* provenientes de diferentes posiciones en la planta madre, obteniendo en las más apicales un enraizamiento y vigor más altos dados por un menor grado de lignificación y desarrollo de esclerénquima que las estaquillas basales.

En relación al tamaño de estaca y en consecuencia a la edad del material madre se observó en este trabajo que al aumentar el número de nudos de 1 a 3 tanto el número de anillos como el espesor de anillo interno se incrementó. Estos cambios anatómicos podrían estar asociados a una mayor madurez del material, observándose mayor presencia de tejidos lignificados, como fibras de esclerénquima y peridermis. A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que a la hora de seleccionar las muestras para propagar se debería tener en cuenta el tamaño de estaca. Muestras con mayor cantidad de nudos indican una mayor lignificación, así como pérdida de competencia para generar raíces adventicias asociado a la madurez fisiológica. A su vez, Hartmann y Kester (1998), Amissah et al. (2008) no identifican una relación causal entre escenificación y capacidad de enraizamiento reducida, ya que las raíces adventicias tienen la posibilidad de romper esta barrera física formada por el esclerénquima y darse paso a través de ella, pudiendo ser la limitante en

especies de difícil enraizamiento la no formación de primordios independientemente de su desarrollo de esclerénquima, tal como se observó en este trabajo.

El enraizamiento adventicio es una respuesta multifactorial que conduce a nuevas raíces en la base de las estaquillas. En este ensayo se observó que los esquejes expuestos a auxinas exógenas aumentaron el espesor del anillo externo de tejido lignificado, así mismo, existió un incremento en la proporción de brechas parenquimatosas. Esto último puede estar ocasionado por la capacidad de la hormona a inducir la división de las células parenquimáticas cerca de los tejidos vasculares, estimulando la formación de raíces adventicias, como también la formación de raíces laterales (Jordan y Casaretto, 2006). Así mismo, Wendling et al. (2014) mencionan el aumento de lignificación y crecimiento secundario al aplicar la hormona en altas dosis.

Cabrera et al. (2010), en estacas de *A. sellowiana* expuestas a diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (AIB, 0 y 2000 ppm), obtuvieron una alta variabilidad de enraizamiento dependiendo del genotipo, donde se observó una respuesta muy variable al tratamiento con AIB, siendo positiva o negativa dependiendo del material genético. La variabilidad genética propia de esta especie se ve reflejada también en su capacidad de propagación vegetativa por medio de estacas semileñosas. Las diferentes dosis utilizadas de las hormonas y la duración de la inmersión pudieron tener un efecto negativo dando como resultado gran cantidad de estacas muertas. Así también, Fachinello (1992) expone que la aplicación exógena de AIB genera respuestas muy diferentes en guayabo. Estudios realizados por Husen y Pal (2007) en estaquillas de *Tectona grandis* Linn. F, muestran que el requerimiento de auxinas para promover el enraizamiento aumentó a medida que el material madre se volvía maduro. Según estos autores se observó una disminución en el nivel endógeno de la hormona en materiales más viejos además de una pérdida de sensibilidad de los tejidos envejecidos a los promotores del enraizamiento.

Durante el transcurso del ensayo se observaron cambios anatómicos, siendo la variable GAP/Ae (%): (relación brecha parenquimatosas en anillo externo, anillo externo) la única que mostró diferencias significativas con un patrón definido. A medida que pasa el tiempo el porcentaje de brechas parenquimatosas ubicadas en el anillo externo aumentan y lo que al principio era un anillo ahora está conformado por células de esclerénquima aisladas. La expansión y proliferación de las células de la corteza, el floema y el cambium que resulta en rupturas de los anillos continuos de esclerénquima, es promovido por tratamientos de auxinas y enraizamiento bajo niebla, pero aun así no se registra formación de primordios de raíz en cultivares difíciles de enraizar de varias especies de frutales (Hartmann y Kester, 1998). Amissah et al. (2008) estudiaron la anatomía de tallo y su relación con las diferencias en la capacidad de

enraizamiento de *Quercus bicolor* y *Quercus macrocarpa*. Al comparar los resultados a campo e invernadero se obtuvieron mayores resultados de enraizamiento en este último, sin embargo, no se observaron diferencias a nivel anatómico, la variable Gap/Ae en ambas especies no mostró diferencias significativas. Estos resultados sugieren que otros factores estarían afectando el enraizamiento. Los autores observaron dos etapas de proliferación celular asociadas al enraizamiento, cada una de las cuales condujo a una expansión radial en ambas especies, en los esquejes que no enraizan solo ocurrió la primera de estas etapas.

En referencia a los resultados de este trabajo, el aumento de las brechas parenquimatosas podría estar relacionado a una etapa de proliferación celular como observaron Amissah et al. (2008), a consecuencia de los procesos metabólicos y anatómicos asociados al crecimiento. Los tratamientos de auxinas y humedad (80%) proveniente de un sistema de niebla intermitente que se utilizó en el ensayo pudo favorecer la expansión y proliferación celular, así como hacen referencia Hartmann y Kester (1998).

6. CONCLUSIONES

- El patrón histológico de *A. sellowiana* presenta características propias de la familia Myrtaceae.
- Los genotipos E y N de *A. sellowiana* difieren anatómicamente. La principal diferencia está dada por la presencia de un anillo interno de tejido multiestratificado lignificado encontrándose principalmente en el genotipo N, según sus características se identificó como peridermis. Este tejido no constituye una barrera física para la formación de raíces, sino que indica un cambio temprano de fase juvenil a madura, dada por la formación temprana de peridermis.
- El anillo externo discontinuo de fibras perifloemáticas no constituye una barrera física que impida el enraizamiento.
- Al aumentar el número de nudos, aumentó el número de anillos y el espesor de anillo interno, en consecuencia, la madurez del material madre afecta la capacidad de generar raíces adventicias.
- Las auxinas exógenas aumentan el espesor del anillo externo de tejido lignificado y la proporción de brechas parenquimatosas.

7. RESUMEN

Acca sellowiana (Berg.) Burret (Myrtaceae), es un árbol o arbusto nativo del Norte del Uruguay y Sur de Brasil, que despierta interés en los productores frutícolas nacionales por el valor económico. Al tratarse de una especie alógama, presenta enorme variabilidad de genotipos en cultivo, obteniéndose una producción con características muy heterogéneas en cuanto a productividad y calidad de frutos. Esto implica la necesidad de mantener genotipos superiores mediante reproducción vegetativa, siendo el método de propagación más utilizado el estaquillado. Un factor limitante para la expansión del cultivo a nivel nacional es la diferencia en capacidad de enraizamiento entre cultivares. El objetivo de este trabajo plantea reconocer e identificar la existencia de posibles factores anatómicos que estén relacionados con la capacidad de enraizamiento en *A. sellowiana*, explorando y caracterizando el patrón histológico en estacas de dos genotipos contrastantes para esta característica. Los genotipos seleccionados para este trabajo fueron TF, identificado como N (enraizamiento menor a 20%) proveniente de la localidad de Laureles, departamento de Tacuarembó y C74 identificado como E (enraizamiento mayor a 80%) proveniente del departamento de Salto. Se tomaron estacas de ramas basales de las plantas madre de los genotipos seleccionados, usando tres tamaños de estaca según el número de nudos presente: uno, dos y tres nudos, por debajo del meristema apical (N1, N2 y N3). Se colocó a enraizar 180 estacas de cada genotipo, se aplicó IBA a la mitad de las muestras para inducir el enraizamiento. Semanalmente se evaluó la presencia o ausencia de raíces en la totalidad de estacas y se extrajeron, al azar, dos por parcela, almacenadas para su posterior análisis anatómico. El diseño experimental se encuentra definido por las siguientes fuentes de variación: genotipo, tratamiento, semana y nudo. Se define como variables dependientes: anillos de tejido lignificado, espesor de anillo interno (micras), espesor de anillo externo (número de células) y separación de anillo lignificado (%): relación Gap/anillo externo. Los resultados obtenidos, indican que ambos genotipos presentan un patrón histológico con características propias de la familia Myrtaceae. Se obtuvieron diferencias anatómicas entre los genotipos que pueden explicar las diferencias en capacidad de enraizamiento. Se identificó la formación de un anillo interno de tejido lignificado, que se corresponde con un desarrollo temprano de peridermis, encontrado principalmente en el genotipo N. Este tejido no constituye una barrera física para la emisión de raíces, sino que indica un cambio de fase de juvenil a maduro y la pérdida de competencia para la formación de estas. La madurez del material madre afecta la capacidad de generar raíces adventicias, en muestras con mayor longitud de estaca aumenta el número de anillos de esclerénquima y espesor de anillo interno. El tratamiento con hormonas muestra un incremento en los GAP. A partir de los resultados de esta investigación se puede definir características anatómicas como herramientas para seleccionar genotipos superiores con buena capacidad de enraizamiento.

Palabras clave: *Acca sellowiana*; Propagación vegetativa; Enraizamiento;
Anatomía de tallo; Ácido Indol -3-butírico (IBA);
Peridermis.

8. SUMMARY

Acca sellowiana (Berg.) Burret (Myrtaceae), is a tree or shrub native to northern Uruguay and southern Brazil, which arouses interest in national fruit producers due to its economic value and its adaptability to our climate. As it is a cross-pollinated species, it presents as a limitation the enormous variability of genotypes in cultivation, obtaining a production with very heterogeneous characteristics in terms of productivity and fruit quality. This implies the need to maintain superior genotypes through vegetative reproduction, the most widely used propagation method being staking. A limiting factor for the expansion of the crop nationwide is the difference in rooting capacity between cultivars. The objective of this work is to recognize and identify the existence of possible anatomical factors that are related to the rooting capacity in *A. sellowiana*, exploring and characterizing the histological pattern in cuttings of two contrasting genotypes for this characteristic. The genotypes selected for this work were TF, identified as N (rooting less than 20%) from the town of Laureles, department of Tacuarembó and C74 identified as E (rooting greater than 80%) from the department of Salto. Cuttings were taken from basal branches of the mother plants of the selected genotypes, using three sizes of cuttings, according to the number of nodes present: one, two and three nodes, below the apical meristem (N1, N2 and N3). 180 cuttings of each genotype were placed to root, IBA was applied to half of the samples to induce rooting. The presence or absence of roots in all the cuttings was evaluated weekly, two were randomly extracted per plot, stored for later anatomical analysis. The experimental design is defined by the following sources of variation: genotype, treatment, week and node. Dependent variables are defined as: lignified tissue rings, inner ring thickness (microns), outer ring thickness (number of cells) and lignified ring spacing (%): Gap / outer ring ratio. The results obtained indicate that both genotypes present a histological pattern with characteristics typical of the Myrtaceae family. Anatomical differences were obtained between the genotypes that may explain the differences in rooting capacity. The formation of an internal ring of lignified tissue was identified, which corresponds to an early development of the peridermis, found mainly in genotype N, this tissue does not constitute a physical barrier for the emission of roots, but rather indicates a phase change of juvenile to mature and the loss of competence for their formation. The maturity of the mother material affects the ability to generate adventitious roots; in samples with a longer stake length, the number of sclerenchyma rings and inner ring thickness increases. Hormone treatment shows an increase in GAP. From the results of this research, anatomical characteristics can be defined as tools to select superior genotypes with good rooting capacity.

Keywords: *Acca sellowiana*; Vegetative propagation; Rooting; Stem anatomy; Indole -3-butyric acid (IBA); Peridermis.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abu-Abied, M.; Szwerdszarf, D.; Mordehaev, I.; Levy, A.; Rogovoy, O.; Belausov, E.; Yaniv, Y.; Uliel, S.; Katzenellenbogen, M.; Riov, J.; Ophir, R.; Sadot, E. 2012. Microarray analysis revealed upregulation of nitrate reductase in juvenile cuttings of *Eucalyptus grandis*, which correlated with increased nitric oxide production and adventitious root formation. *The Plant Journal*. 71:787-799.
2. Amissah, J. N.; Paolillo, J. D.; Bassuk, N. 2008. Adventitious Root Formation in Stem Cuttings of *Quercus bicolor* and *Quercus macrocarpa* and Its Relationship to Stem Anatomy. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 133 (4):479-486.
3. Armstrong, L.; Duarte, M. R.; Obdulio, M. 2011. Morpho-anatomy of the leaf and stem of *Eugenia pyriformis*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 22 (3):475-481.
4. Beakbane, A. B. 1961. Structure of the Plant Stem in Relation to Adventitious Rooting. (en línea). *Nature*. 192:954-955. Consultado 16 abr. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.1038/192954a0>
5. Bellini, C.; Pacurar, D.; Perrone, I. 2014. Adventitious Roots and Lateral Roots: Similarities and Differences. (en línea). *Annual Review of Plant Biology*. 65:639-666. Consultado 4 mar. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035645>
6. Beyl, C. A.; Trigiano, R. N. 2015. Plant propagation concepts and laboratory exercises. 2nd. ed. Boca Raton, FL, CRC. 480 p.
7. Bray, E.; Bailey-Serres, J.; Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Maryland, USA, American Society of Plant Physiologists. pp. 1158-1203.
8. Bryant, P. H.; Trueman, S. J. 2015. Stem anatomy and adventitious root formation in cuttings of *Angophora*, *Corymbia* and *Eucalyptus*. (en línea). *Forests*. 6 (4):1227-1238. Consultado 12 abr. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.3390/f6041227>

9. Cabrera, D.; Rodríguez, P.; Vignale, B.; Mara, V. 2010. Avances en la propagación por enraizamiento de estacas semileñosas de guayabo del país (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). In: Encuentro Nacional sobre Frutos Nativos (5º., 2010, Salto). Trabajos presentados. Salto, INIA. pp. 43-47 (Actividades de Difusión no. 602).
10. _____; Nebel, J. P.; Lombardo, P.; Rodríguez, P.; Zoppolo, R.; Pereira, C. 2012. Avances en la selección de guayabo del país. In: Encuentro Nacional sobre Frutos Nativos (6º., 2012, Canelones). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 38-43 (Actividades de Difusión no. 679).
11. Cacciopo, O. 1984. La Feijoa: manuale pratico. Roma, Italia, Ediciones per l'Agricoltura. 80 p.
12. _____ 1988. La feijoa. Madrid, Mundi-Prensa. 79 p.
13. Celestino, C.; Hernández, I.; Carneros, E.; López-Vela, D.; Toribio, M. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. Investigación Agraria. Sistemas y Recursos forestales. 14 (3):345-357.
14. Ciccarelli, D.; Pagni, A. M.; Cesare Andreucci, A. 2003. Ontogeny of secretory cavities in vegetative parts of *Myrtus communis* L. (Myrtaceae): an example of schizolysigenous development. Journal of Plant Sciences. 51:193-198.
15. Cortadi, A.; Di Sapio, O.; Gattuso, M. 1996. Caracteres anatómicos de tres especies medicinales de la Familia Myrtaceae. Acta Farmacéutica Bonaerense. 15 (2):109-123.
16. Correa, L. D. R.; Fett-Neto, A. G. 2004. Effects of temperature on adventitious root development in microcuttings of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. Journal of Thermal Biology. 29 (6):315-324.

17. Cruz, C.; Escanda, F.; Machado, J.; Rameau, C. 2012. Caracterización de una población de guayabo del país (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret) de pulpa rosada. In: Encuentro Nacional sobre Frutos Nativos (6º., 2012, Canelones). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 45-47 (Actividades de Difusión no. 679).
18. Da Rocha Corrêa, L.; Troleis, J.; Mastroberti, A. A.; Mariath, J. E.; Fett-Neto, A. G. 2012. Distinct modes of adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*. 14 (1):100-109.
19. Davies Jr. F. T.; Lazarte, J. E.; Joiner, J. N. 1982. Initiation and development of roots in juvenile and mature leaf bud cuttings of *Ficus pumila* L. *American Journal of Botany*. 69 (5):804-811.
20. De Klerk, G. J.; Van Der Krieken, W.; de Jong, J. C. 1999. Review the formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 35 (3):189-199.
21. _____. 2002. Rooting of microcuttings: theory and practice. (en línea). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 38 (5):415-422. Consultado 10 abr. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.1079/IVP2002335>
22. Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; González, L.; Tablada, M.; Robledo, C. W. 2008. InfoStat, versión 2008. Córdoba, Argentina, Universidad Nacional de Córdoba. FCA. Grupo InfoStat. 336 p.
23. Ducroquet, J. P. H. J.; Rodrigues Hickel, E.; Nodari, R. O. 2000. Goiabeira-Serrana (*Feijoa sellowiana*). Jaboticabal, FUNEP. 66 p. (Serie Frutas Nativas no. 5).
24. Esau, K. 1985. Anatomy of seed plants. Santa Bárbara, USA, University of California. 512 p.
25. Fachinello, J. C.; Nachtigal, J. C. 1992a. Propagação da Goiabeira serrana *Feijoa sellowiana* Berg, a través da mergulhia de cepa. *Scientia Agricola*. 49 (1):37-39.
26. _____.; Mielke, M. S.; Nachtigal, J. Da C. 1992b. Propagação vegetativa da goiabeira serrana. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 14 (3):233-236.

27. Fett-Neto, A. G.; Fett, J. P.; Goulart, L. W. V.; Pasquali, G.; Termignoni, R. R.; Ferreira, A.G. 2001. Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. (en línea). *Tree Physiology*. 21 (7):457-464. Consultado 12 abr. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.1093/treephys/21.7.457>

28. Finatto, T.; Dos Santos, K. L.; Steiner, N.; Bizzocchi, L.; Holderbaum, D. F.; Ducroquet, J. P.; Guerra, M.; Nodari, R. 2011. Late-acting self-incompatibility in *Acca sellowiana* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany*. 59 (1):53-60.

29. Fischer, G. D.; Miranda, G.; Mazorra, M. 2003. Cultivo, poscosecha y exportación de la feijoa (*Acca sellowiana* Berg). Bogotá, CO, Produmedios. 152 p.

30. Gaspar, T.; Kevers, C.; Hausman, J. F.; Berthon, J. Y.; Ripetti, V. 1992. Practical uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots. (en línea). *Agronomie*. 12 (10):757-765. Consultado 15 abr. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.1051/agro:19921003>

31. Geiss, G.; Gutierrez, L.; Bellini, C. 2009. Adventitious root formation; new insights and perspectives. (en línea). *Annual Plant Reviews*. 37 (1):127-156. Consultado 20 abr. 2019. Disponible en https://www.google.com/search?rlz=1C1SQJL_esUY843UY843&sxsrf=AOaemvluc4vsnLcX4iVFU_xeUovwDboWw:1634525599568&q=annual+plant+reviews,+root+development&stick=H4sIAAAAAA AAAAONgVuLRT9c3NErKLU42LDd6xGjOLfDyxz1hKb1Ja05eY9Tg4grOyC93zSvJLkKukuJig7IEpPi4UDTyLGJVS8zLK03MUSjIScwrUShKLctMLS_WUSjKzy9RSEktS83JL8hNzSsBAAc2DwpzAAAA&sa=X&ved=2ahUKEwihyfOt-tLzAhV_FbkGHV9pAfwQ1i96BAgCEDM

32. Grela, I. 2004. Geografía florística de las especies arbóreas de Uruguay; propuesta para la delimitación de dendrofloras. Tesis de MSc. Montevideo, Uruguay. PEDECIBA. 97 p.

33. Goulart, P.B.; Xavier, A.; Iarema, L.; Otoni, W.C. 2014. Morfoanatomia da rizogênese adventícia em miniestacas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. (en línea). *Ciencia Florestal*. 24:521-532. Consultado 10 abr. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.5902/1980509815721>
34. Hackett, W. P. 1987. Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht, Springer. v.1, 421 p.
35. Hartmann, H.; Kester, D. 1998. Propagación de plantas: principios y prácticas. 6ª. ed. Ciudad de México, MX, Continental. 785 p.
36. Husen, A.; Pal, M. 2006. Variation in Shoot Anatomy and Rooting Behaviour of Stem Cuttings in Relation to Age of Donor Plants in Teak (*Tectona grandis* Linn. f.). (en línea). *New Forests*. 31:57-73. Consultado 4 mar. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s11056-004-6794-5>
37. _____; _____. 2007. Metabolic changes during adventitious root primordium development in *Tectona grandis* Linn. f. (teak) cuttings as affected by age of donor plants and auxin (IBA and NAA) treatment. (en línea). *New Forests*. 33 (3):309-323. Consultado 6 mar. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s11056-006-9030-7>
38. _____. 2012. Changes of soluble sugars and enzymatic activities during adventitious rooting in cuttings of *Grewia optiva* as affected by age of donor plants and auxin treatments. (en línea). *American Journal of Plant Physiology*. 7 (1):1-16. Consultado 6 mar. 2019. Disponible en <https://scialert.net/abstract/?doi=ajpp.2012.1.16>
39. Jordán, M.; Casaretto, J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento; auxinas, giberelinas y citocininas. (en línea). In: Squeo, F. A.; Cardemil, L. eds. *Fisiología vegetal*. La Serena, Chile, Universidad de la Serena. p. irr. Consultado 13 may. 2019. Disponible en <http://www.biouls.cl/librofv/web/index03.php>

40. Kevers, C.; Hausman, J. F.; Faivre-Rampant, O.; Evers, D.; Gaspar, T. 1997. Hormonal control of adventitious rooting: progress and questions. (en línea). *Journal of Applied Botany*. 71 (3-4):71-79. Consultado 6 mar. 2019. Disponible en <https://hdl.handle.net/2268/184111>
41. Legrand, D. 1968. Las Mirtáceas del Uruguay, III. Facultad de Agronomía (Montevideo). Boletín no. 101. 80 p.
42. Li, S. W.; Xue, L.; Xu, S.; Feng, H.; An., L. 2009. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *The Botanical Review*. 75 (2):230-247.
43. Lucas, E. J.; Holst, B.; Sobral, M.; Mazine, F. F.; Nic Lughadha, E. M.; Barnes Proença, C. E.; Ribeiro da Costa, I.; Vasconcelos, Thais N. C. 2019. A New Subtribal Classification of Tribe Myrteae (Myrtaceae). (en línea). *Systematic Botany*. 44 (3):560-569. Consultado 14 abr. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.1600/036364419X15620113920608>
44. Mattos, J. R. 1969. O gênero Feijoa Berg. *Arquivo Botânico Estado de São Paulo*. 4:263-267.
45. _____. 1986. A goiabeira serrana. Porto Alegre, Brasil, Instituto de Pesquisas de Recursos Naturais Renováveis "AP". 84 p. (Publicação IPRNR no.19).
46. Mayer, J. L. S.; Cardoso, N. A.; Cuquel, F.; Bona, C. 2008. Formação de raízes em estacas de duas espécies de *Calliandra* (Leguminosae - Mimosoideae). *Rodriguésia*. 59 (3):487-495.
47. Metcalfe, C.R.; Chalk, L. 1950. *Anatomy of the dicotyledons*. Oxford, UK, Oxford University. s.p.
48. Pacurar, D. I.; Perrone, I.; Bellini, C. 2014. Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. (en línea). *Physiologia Plantarum*. 151 (1):83-96. Consultado 6 mar. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.1111/ppl.12171>

49. Perea Dallos, M.; Fischer, G.; Lasprilla, D. M. 2010. Feijoa. *Acca sellowiana* Berg. In: Perea Dallos, M.; Matallana Ramírez, L. P.; Tirado Perea, P. eds. Biotecnología aplicada al mejoramiento de los cultivos de frutas tropicales. Bogotá, UNIBIBLOS. pp. 300-349.
50. Perry, F.; Trueman, S. J. 1999. Cutting propagation of Victorian smoke bush, *Conospermum mitchellii* (Proteaceae). South African Journal of Botany. 65 (3):243-244.
51. Pijut, P. M.; Woeste, K. E.; Michler, C. H. 2011. Promotion of adventitious root formation of difficult-to-root hardwood tree species. Horticultural Reviews. 38:213-251.
52. Pop, T. I.; Pamfil, D.; Bellini, C. 2011. Auxin control in the formation of adventitious roots. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 39 (1):307-316.
53. Popenoe, F. W. 1912. Feijoa sellowiana: its history, culture and varieties. Pomona College Journal of Economic Botany. 2 (1):217-242.
54. Porfirio, S.; da Silva, M. D. G.; Cabrita, M. J.; Azadi, P.; Peixe, A. 2016. Reviewing current knowledge on olive (*Olea europea* L.) adventitious root formation. (en línea). Scientia Horticulturae. 198:207-226. Consultado 3 abr. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.034>
55. Pritsch, C.; Quezada, M.; Vazquez, S.; Mazzella, C.; Vaio, M.; Vignale, B.; Cabrera, D. 2016. Progresos en la caracterización del genoma de *Acca sellowiana* (Berg) Burret. (en línea). In: Latin American Congress of Genetics (16th.), Congress of the Uruguayan Society of genetics (4th.), Annual Meeting of the Genetics Society of Chile (49th.), Argentine Congress of Genetics (45th, 2016, Montevideo, Uruguay). Abstracts. Journal of Basic Applied Genetics. 27 (suppl. 1):56-57. Consultado 6 abr. 2019. Disponible en https://sag.org.ar/jbag/wp-content/uploads/2020/01/V.XXVIII_2016_Suppl1_19092016.pdf
56. Puppo, M. 2008. Prospección y caracterización de poblaciones silvestres de *Acca sellowiana* (guayabo del país). Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 123 p.

57. Quezada Macchiavello, M. 2011. Construcción del primer mapa de ligamiento de la especie *Acca sellowiana* (Berg.) Burret empleando marcadores moleculares. (en línea). Tesis de Maestría. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 58 p. Consultado 8 mar. 2019. Disponible en <https://hdl.handle.net/20.500.12008/1830>
58. Rasmussen, A.; Hosseini, S. A.; Hajirezaei, M. R.; Druege, U.; Geelen, D. 2015. Adventitious rooting declines with the vegetative to reproductive switch and involves a changed auxin homeostasis. (en línea). *Journal of Experimental Botany*. 66 (5):1437-1452. Consultado 5 mar. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.1093/jxb/eru499>
59. Rivas, M.; Vignale, B.; Camussi, G.; Pritsch, C.; Puppo, M. 2007. Los recursos genéticos de *Acca sellowiana* (Berg.) Burret en Uruguay. *In*: Clausen, A.; Condón, F.; Berretta, A. eds. Avances de investigación en recursos genéticos del cono Sur II. Montevideo, IICA/ PROCISUR. pp.103 -112.
60. Ross, S.; Pechi, E.; Scaltritti, J.; Rodríguez, S.; Castillo, A.; Speroni, G.; Vignale, B.; Cabrera, D.; Speranza, P. 2015. Estudio sobre rizogénesis en "guayabo del país". *In*: Encuentro Nacional sobre Frutos Nativos (7º., 2010, Colonia). Trabajos presentados. Colonia, INIA. pp. 15-16 (Actividades de Difusión no. 754).
61. Salvarrey, M. J. 2008. Evaluación de diferentes técnicas de propagación vegetativa en "guayabo del país" (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret.). Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 79 p.
62. Sampaio, V. R.; Barbin, D. 1983. Propagação da pereira através de estacas folhosas em ambiente de nebulização. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*. 40:509-517.

63. Santos, K. L.; Steiner, N.; Ducroquet, J. P. H. J.; Guerra, M. P.; Nodari, R. O. 2005. Domesticación da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) no Sul do Brasil. In: Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe (SIRGEALC) (5º., 2005, Montevideo). Trabajos presentados. Agrociencia (Uruguay). (1-2):29-33. Consultado 8 mar. 2019. Disponible en [http://www.fagro.edu.uy/agrociencia/VOL9/Agrociencia.%20\(2005\)%20Vol.%20IX%20Num%201%20y%20Num%202.pdf](http://www.fagro.edu.uy/agrociencia/VOL9/Agrociencia.%20(2005)%20Vol.%20IX%20Num%201%20y%20Num%202.pdf)
64. Scaltritti, J. 2016. Búsqueda de genes candidatos asociados con la diferenciación de raíces adventicias en *Acca sellowiana* (Berg.) Burret. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 56 p.
65. Sidhu, D. S. 1992. Genetic basis of vegetative propagation and its impact on tree breeding strategies. In: Kesava, R. K. ed. Vegetative propagation and biotechnologies for tree improvement. Dehra Dun, New Delhi, Natraj Publishers. pp. 53-70.
66. Silva, G. S.; Ferraro, A.; Ogando, F. I.; Aguiar, C. L.; Appezzato da Gloria, B. 2020. Structures related to resprouting potential of two Myrtaceae species from Cerrado: morpho-anatomical and chemical studies. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 92 (1):1-18.
67. Soffiatti, P.; Angyalossy-Alfonso, V. 1999. Estudo anatômico comparativo do lenho e da casca de duas espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). (en línea). Brazilian Journal of Botany. 22 (2):175-184. Consultado 4 abr. 2019. Disponible en <https://www.scielo.br/j/rbb/a/MsQ3PrH4HcK7T5KH7LXWbpw/?lang=pt>
68. Stevens, M. E.; Pijut, P. M. 2017. Origin of adventitious roots in black walnut (*Juglans nigra*) softwood cuttings rooted under optimized conditions in a fog chamber. (en línea). New Forests. 48:685-697. Consultado 18 may. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s11056-017-9592-6>
69. Taiz, L.; Zeiger, E. 2002. Plant Physiology. 3rd. ed. Sunderland, Sinauer. 690 p.

70. Thomas, P.; Schiefelbein, J. 2002. Cloning and characterization of an actin depolymerizing factor gene from grape (*Vitis vinifera* L.) expressed during rooting in stem cuttings. *Plant Science*. 162 (2):283-288.
71. Thorp, T.; Bielecki, R. 2002. Feijoas: origins, cultivation and uses. Auckland, New Zealand, Hort Research. 87 p.
72. Urraburu, M. 2017. Comportamiento poscosecha y funcional de materiales genéticos de guayabo del país (*Acca sellowiana* (o. berg.) burret) y arazá (*Psidium cattleianum* Sab). Tesis Mag en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 157 p.
73. Van Vliet, G. J. C. M.; Baas, P. 1984. Wood anatomy and classification of Myrtales. (en línea). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 71 (3):783-800. Consultado 17 may. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.2307/2399162>
74. Vanzini, M. 2016. Desarrollo de un sistema de propagación in vitro en “guayabo del país” (*Acca sellowiana* (Berg.) Burret.) Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 63 p.
75. Vignale, B.; Nebel, J. P.; Cabrera, D.; Bisio, L. 2005a. Estudio de diferentes orígenes de guayabo del país *Acca sellowiana* (Berg.) In: Congreso Nacional de la SUHF (10º., 2005, Montevideo). Trabajos presentados. Montevideo, Uruguay, s.e. p. 80.
76. _____; Bisio, L. 2005b. Selección de frutales nativos en Uruguay. *Agrociencia* (Uruguay). 9 (1-2):35-39.
77. _____; Cabrera, D.; Nebel, J. P.; Lombardo, P.; Rodríguez, P.; Zoppolo, R.; Pereira, C. 2012. Avances en estudios genómicos en guayabo del país. (*Acca sellowiana*) In: Encuentro Nacional sobre Frutos Nativos (6º., 2012, Canelones). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 38-44 (Actividades de Difusión no. 679).

78. Wendling, I.; Brooks, P.; Trueman, S. 2014. Topophysis in *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* seedlings: adventitious rooting capacity, stem anatomy, and auxin and abscisic acid concentrations. (en línea). *New Forests* 46(1):107-120. Consultado 6 may. 2019. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11056-014-9451-7>
79. White, J.; Lovell, P. H. 1984. The anatomy of root initiation in cuttings of *Griselinia littoralis* and *Griselinia lucida*. (en línea). *Annals of Botany*. 54 (1):7-20. Consultado 2 may. 2019. Disponible en <http://www.jstor.org/stable/42756973>
80. Wiesman, Z.; Riov, J.; Epstein, E. 1988. Comparison of movement and metabolism of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid in mung bean cuttings. (en línea). *Physiologia Plantarum*. 74 (3):556-560. Consultado 7 mar. 2019. Disponible en <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1988.tb02018.x>
81. Zhang, M.; Tang, H-R.; Wang, D.; Ren, S-X.; Liu, R. 2009. A study of rooting characteristics and anatomical structure of Feijoa cuttings. *Agricultural Journal*. 4 (2):86-90.