



**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
(SECCIÓN DE INGENIERÍA AGRARIA)**

GRADO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y DEL MEDIO RURAL

**PROPAGACIÓN VEGETATIVA DEL CULTIVAR
LEUCOSPERMUM 'SPIDER', FAMILIA PROTEACEAE. ANÁLISIS
HISTOLÓGICO**

Isabel Hernández Morales
La Laguna, septiembre de 2016

**AUTORIZACIÓN DEL PROYECTO/TRABAJO
FIN DE GRADO POR SUS DIRECTORES**

CURSO 2015/2016

DIRECTOR – COORDINADOR: Dña. María Candelaria Vera Batista,

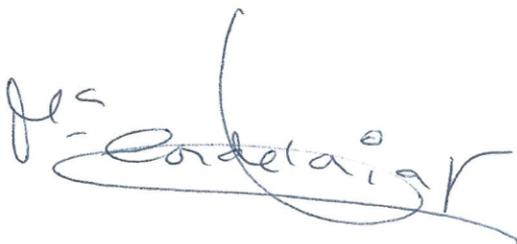
DIRECTOR: Dña. María del Carmen Alfayate Casañas,

como Directores de la alumna Isabel Hernández Morales en el PTFG titulado:

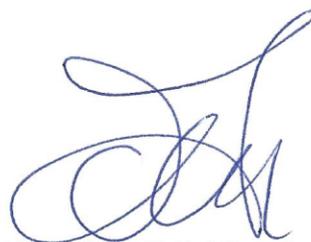
**PROPAGACION VEGETATIVA DEL CULTIVAR *LEUCOSPERMUM*
'SPIDER', FAMILIA PROTEACEAE. ANÁLISIS HISTOLÓGICO nº de Ref. 5.**

Damos nuestra autorización para la presentación y defensa de dicho PTFG, a la vez que confirmamos que el alumno ha cumplido con los objetivos generales y particulares que lleva consigo la elaboración del mismo y las normas del Reglamento de Régimen Interno para la realización de PTFG de la EPSI-Sección de Ingeniería Agraria.

La Laguna, a 2 de septiembre de 2016



Fdo: Dña. M^a C Vera Batista



Fdo: Dña. M^a C Alfayate Casañas

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE PROYECTOS Y TRABAJOS FIN DE
GRADO DE LA EPSI-SECCIÓN DE INGENIERÍA AGRARIA**

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a mis tutoras de este Trabajo Fin de Grado, Dña. M^a Candelaria Vera Batista y Dña. M^a del Carmen Alfayate Casañas por su ayuda, dedicación, sugerencias y correcciones en la realización del mismo. Gracias por el apoyo y comprensión en estos meses de trabajo.

A Emma Suárez y a Patricia Marrero por su contribución a lo largo de la realización de este ensayo.

A Maritina por el empeño con el que realizó su trabajo, y a Miguel Corbella por su ayuda en el laboratorio.

A mi hermana Graciela por su ánimo, apoyo y ayuda en todo este proceso así como a mi madre por su cariño y comprensión. Siempre estaré agradecida.

A Saúl por su incansable apoyo, paciencia y comprensión; sobre todo por animarme a que pueda lograr que todos mis sueños se hagan realidad. Y a sus padres que han marcado un antes y un después.

A mi familia y amigos, especialmente a María Elena, por sus mensajes de ánimo y estar siempre ahí.

Y por último, a mis profesores y compañeros, agradecerles el ánimo que he recibido en estos años.

A mi padre

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	21
II. OBJETIVOS	25
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	29
III. 1. TAXONOMÍA, DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA.....	29
III. 1. 1. Familia Proteaceae	29
III. 1. 1. 1. Género <i>Leucospermum</i>	30
III. 1. 1. 1. 1. Descripción parental.....	33
III. 1. 1. 1. 1. 1. <i>Leucospermum formosum</i>	33
III. 1. 1. 1. 1. 2. <i>Leucospermum tottum</i>	35
III. 1. 1. 1. 2. <i>Leucospermum</i> ‘Spider’	37
III. 2. PROPAGACIÓN VEGETATIVA DE PROTEAS	39
III. 2. 1. Propagación por estacas	40
III. 2. 1. 1. Tipos de estacas.....	40
III. 2. 1. 1. 1. Estacas de tallo	40
III. 2. 1. 1. 2. Estacas de raíz	41
III. 2. 1. 1. 3. Estacas de hoja	41
III. 2. 1. 1. 4. Estacas de hoja y yema.....	42
III. 2. 1. 2. Selección de las estacas.....	42
III. 2. 1. 3. Obtención y preparación del material vegetal	47
III. 2. 1. 4. Factores que influyen en el enraizamiento.....	48
III. 2. 1. 4. 1. Condiciones ambientales.....	48
III. 2. 1. 4. 1. 1. Humedad relativa	49
III. 2. 1. 4. 1. 2. Temperatura.....	50
III. 2. 1. 4. 1. 3. Luz.....	51
III. 2. 1. 4. 1. 4. Aireación	53
III. 2. 1. 4. 2. Medio de enraizamiento	54
III. 2. 1. 4. 3. Tratamientos químicos que mejoran el enraizamiento	56
III. 2. 1. 4. 3. 1. Hormonas vegetales	56
III. 2. 1. 4. 3. 2. Otros reguladores de crecimiento.....	63

III. 2. 1. 4. 4. Control sanitario.....	68
III. 2. 1. 4. 4. 1. Plagas, malas hierbas y enfermedades en el cultivo de proteas.....	69
III. 3. ESTUDIO HISTOLÓGICO.....	72
III. 3. 1. Los tejidos en las plantas vasculares.....	72
III. 3. 1. 1. Tejidos meristemáticos.....	72
III. 3. 1. 2. Cambium vascular.....	73
III. 3. 1. 3. Tejidos parenquimáticos.....	74
III. 3. 1. 4. Tejidos mecánicos o de sostén.....	76
III. 3. 1. 5. Tejidos vasculares: xilema y floema.....	78
III. 3. 1. 6. Tejidos protectores.....	79
III. 3. 2. Familia Proteaceae. Histología de la hoja.....	80
III. 3. 3. Familia Proteaceae. Histología del tallo.....	82
IV. PARTE EXPERIMENTAL.....	87
IV. 1. ENSAYO I: Efecto del etanol, peróxido de hidrógeno, IBA y combinación de los mismos sobre el enraizamiento de las estacas de <i>Leucospermum</i> ‘Spider’.....	87
IV. 1. 1. Materiales y métodos.....	87
IV. 1. 2. Resultados y discusión.....	91
IV. 1. 2. 1. Evolución de las estacas.....	91
IV. 1. 2. 2. Análisis estadístico de los datos obtenidos en el ensayo.....	97
IV. 1. 2. 2. 1. Estacas trasplantables.....	97
IV. 1. 2. 2. 2. Longitud de las raíces en estacas trasplantables.....	98
IV. 1. 2. 2. 3. Índice de enraizamiento.....	100
IV. 2. ENSAYO II: Estudio histológico de las estacas de <i>Leucospermum</i> ‘Spider’.....	103
IV. 2. 1. Materiales y métodos.....	103
IV. 2. 1. 2. Preparación de muestras para inclusión en paraplast plus.....	104
IV. 2. 1. 2. 1. Técnicas generales de fijación, inclusión y tinción de las muestras prototipo.....	105
IV. 2. 1. 3. Preparación de muestras para inclusión en resina Spurr (1969).....	109
IV. 2. 1. 3. 1. Técnicas generales de fijación, inclusión en resina y tinción.....	109
IV. 2. 1. 4. Preparación de epidermis de hojas para microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de barrido (MEB).....	110

IV. 2. 1. 5. Preparación de los reactivos.....	112
IV. 2. 2. Resultados y discusión.....	114
IV. 2. 2. 1. Características estructurales de las muestras prototipo de <i>Leucospermum</i> ‘Spider’.....	114
IV. 2. 2. 2. Resumen de las características tisulares.....	127
IV. 2. 2. 3. Estudio de la anatomía de las estacas de <i>Leucospermum</i> ‘Spider’ tras la aplicación de los diferentes tratamientos.....	129
V. CONCLUSIONES	143
VI. PROPUESTAS DE FUTURO	149
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	153

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1.- Mapa de Sudáfrica (Continente africano).....	32
Fotografía 2.- Cabezas florales de <i>L. formosum</i>	34
Fotografía 3.- Porte de <i>L. formosum</i>	34
Fotografía 4.- Cabeza floral de <i>L. tottum</i>	36
Fotografía 5.- Porte de <i>L. tottum</i>	36
Fotografía 6.- Diferentes estadios de apertura de una inflorescencia de <i>L. 'Spider'</i>	38
Fotografía 7.- Cultivo de <i>Leucospermum 'Spider'</i> en la Sección de Ingeniería Agraria de la Escuela Politécnica Superior de Ingeniería, de la Universidad de La Laguna.....	38
Fotografía 8.- <i>Leucospermum 'Spider'</i> en cultivo.....	87
Fotografía 9.- Estacas de madera semidura de <i>Leucospermum 'Spider'</i>	88
Fotografía 10.- Preparación de los tratamientos aplicados en este ensayo.....	89
Fotografía 11.- Estacas colocadas en las bandejas de propagación.....	89
Fotografía 12.- Vista panorámica de la colocación de las bandejas.....	90
Fotografía 13.- Corte de muestras.....	104
Fotografía 14.- Cortes transversales de tallos y hojas jóvenes y maduros.....	104
Fotografía 15.- Piezas de Leuckart.....	106
Fotografía 16.- Micrótopo Reichert-jung Mod. 1130/Biocut.....	107
Fotografía 17.- Portaobjetos sobre la placa calefactora.....	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Frecuencia de estacas trasplantables observadas frente a estacas trasplantables esperadas a las 20 semanas desde el comienzo del ensayo.....	97
Tabla 2.- Efecto del etanol, peróxido de hidrógeno, IBA y combinación de los mismos sobre el porcentaje de estacas trasplantables de <i>Leucospermum 'Spider'</i>	98
Tabla 3.- Efecto del tratamiento sobre la longitud de las raíces (cm) de las estacas trasplantadas.....	99
Tabla 4.- Efecto del tratamiento sobre el índice de enraizamiento (escala de Criley y Parvin, 1979) de las estacas de <i>Leucospermum 'Spider'</i>	100
Tabla 5.- Tratamientos empleados en la propagación por estacas de <i>Leucospermum 'Spider'</i>	103
Tabla 6.- Protocolo de inclusión en resina Spurr.....	110
Tabla 7.- Protocolo de preparación de las muestras para el estudio al MEB.....	111

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1.- Efecto del etanol, peróxido de hidrógeno, IBA y combinación de los mismos sobre el enraizamiento de las estacas de <i>Leucospermum 'Spider'</i> a las 6, 8 y 10 semanas desde el inicio del ensayo.....	94
Gráfica 2.- Efecto del etanol, peróxido de hidrógeno, IBA y combinación de los mismos sobre el enraizamiento de las estacas de <i>Leucospermum 'Spider'</i> a las 12, 14 y 16 semanas desde el inicio del ensayo.....	95
Gráfica 3.- Efecto del etanol, peróxido de hidrógeno, IBA y combinación de los mismos sobre el enraizamiento de las estacas de <i>Leucospermum 'Spider'</i> a las 12, 14 y 16 semanas desde el inicio del ensayo.....	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Hoja joven.	114
Fig. 1.1: Visión panorámica de la hoja joven en la que se observaron epidermis, colénquima angular y haces vasculares.	114
Fig. 1.2: Obsérvese la distribución de los haces vasculares y mesófilo con taninos.....	114
Fig. 1.3: Epidermis adaxial donde se mostró los estomas y la base de los tricomas.....	114
Fig. 1.4: Ornamentación del tricoma.....	114
Fig. 1.5: Nótese el parénquima empalizada, vaina del haz y haz vascular.....	114
Figura 2.- Hoja madura.	116
Figura 2.1: Visión panorámica de la hoja madura, en la que se observaron la epidermis, mesófilo con taninos, haces vasculares primarios y secundarios.	116
Figura 2.2: Sección paradermal de la epidermis abaxial con tricomas y estomas.....	116
Figura 3.- Hoja madura.	118
Figura 3.1: Epidermis adaxial y base de un tricoma.	118
Figura 3.2: Ornamentación del tricoma.....	118
Figura 3.3: Estoma paracítico y células anexas.....	118
Figura 3.4: Detalle de un haz vascular. Obsérvese el xilema, cambium vascular, floema y esclerénquima perivascular. Además células parenquimáticas con cloroplastos próximos a la pared células.	118
Figura 4.- Tallo joven	122
Fig. 4.1: Panorámica que mostró la disposición concéntrica de los tejidos: epidermis, córtex, haces vasculares y médula.....	122
Fig. 4.2: Epidermis con cutícula lisa, colénquima angular y tricomas.....	122
Fig. 4.3: Detalle de células pétreas corticales.	122
Fig. 4.4: Córtex parenquimático y haces vasculares colaterales con parénquima interfascicular y médula central con compuestos fenólicos.	122
Figura 5.- Tallo maduro.	124
Fig. 5.1: Panorámica que mostró la disposición de la epidermis, colénquima, haces vasculares y médula.	124
Fig. 5.2: Epidermis con cutícula lisa, tricomas y colénquima angular.....	124
Fig. 5.3: Córtex parenquimático con depósitos fenólicos y haces vasculares colaterales bien desarrollados.....	124
Figura 6.- Fotomicrografías de microscopio estereoscópico y fotomicrografías a MO de la porción basal estacas después del Tr2	129
Fig. 6.1: S.t. de la estaca que mostró la disposición del córtex, haces vasculares y médula.	129
Fig. 6.2: Detalle de la s.t. de un callo.	129
Figs. 6.3 - 6.4: Panorámica de la parte basal de la estaca con numerosos callos y raíces.	129
Fig.6.5: Visión panorámica de la parte basal de la estaca, donde se observaron los diferentes planos que se desarrollan.....	129
Fig. 6.5i: Detalle de la sección enmarcada de la Fig. 6.5. Obsérvese los meristemoides.	129
Figura 7.- Fotomicrografías a MO de la porción basal de las estacas después del Tr2	131
Fig. 7.1: S.t. del parénquima cortical y grupo de células pétreas.	131

Fig. 7.1i: Detalle de la zona enmarcada de la Fig. 7.1. Obsérvense los meristemoides.	131
Fig. 7.2: S.t. donde se pudo apreciar el xilema y el cambium vascular, rodeados de parénquima.	131
Fig. 7.3: Zona con modificación en los planos de las divisiones celulares.	131
Figura 8.- Fotomicrografías de microscopio estereoscópico y fotomicrografías a MO de la porción basal estacas después del Tr5.	132
Fig. 8.1: Panorámica de una de las porciones obtenidas al seccionar la parte basal de la estaca para su posterior inclusión en resina. Obsérvense la disposición concéntrica de los tejidos: córtex, anillo de haces vasculares y médula.	132
Fig. 8.2: Panorámica de la parte basal de la estaca con numerosos callos y raíces.	132
Fig. 8.3: Detalle de la s.t. de un callo.	132
Fig. 8.4: S.t. que mostró esclerénquima, gran actividad del cambium vascular y alargamiento del haz vascular.	132
Figura 9.- Fotomicrografías a MO de la porción basal de las estacas después del Tr5.	134
Fig. 9.1: S.t. del parénquima cortical y parénquima xilemático. Obsérvense los meristemoides.	134
Fig. 9.2: S.t. donde se observó el esclerénquima y abundantes células pétreas, rodeados de parénquima.	134
Fig. 9.3: Bandas concéntricas de células cuyas características corresponden a xilema, cambium vascular y floema en el córtex. Además se distingue el esclerénquima, células pétreas y depósitos fenólicos.	134
Figura 10.- Fotomicrografías de microscopio estereoscópico y fotomicrografías a MO de la porción basal estacas después del Tr6.	135
Fig. 10.1: S.t. de la estaca que mostró la disposición del córtex, haces vasculares y médula. ..	135
Fig. 10.2: Detalle de la s.t. de un callo.	135
Fig. 10.3: Panorámica de la s.t. Obsérvense la disposición concéntrica de los tejidos, y las raíces en la parte basal de la estaca.	135
Fig. 10.4: Panorámica de la parte basal de la estaca con numerosas raíces.	135
Fig. 10.5: Visión panorámica de la parte basal de la estaca, donde se mostraron los diferentes planos que se desarrollan.	135
Fig. 10.5a: Detalle de la zona enmarcada de la Fig. 10.5. Obsérvense los meristemoides.	135
Fig. 10.5b: Detalle de la zona enmarcada de la Fig. 10.5. Obsérvense esclerénquima, gran actividad del cambium vascular y parénquima.	135
Figura 11.- Fotomicrografías a MO de la porción basal de las estacas después del Tr6.	137
Fig. 11.1: S.t. del parénquima cortical. Obsérvense el alargamiento de los haces vasculares y entre ellos el parénquima interfascicular.	137
Fig. 11.2: S.t. con bandas concéntricas de células cuyas características corresponden a xilema, cambium vascular y floema en el córtex. Además se diferenciaron el esclerénquima y células pétreas.	137

TÍTULO: PROPAGACION VEGETATIVA DEL CULTIVAR *LEUCOSPERMUM* ‘SPIDER’, FAMILIA PROTEACEAE. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

AUTORES: Hernández, I.; Vera Batista, M.C.; Alfayate, M.C.

RESUMEN

Palabras claves: *Leucospermum*, enraizamiento, reguladores de crecimiento, tejidos vegetales, estructura tisular.

Este ensayo consistió en estudiar la influencia de la concentración de IBA (2000 , 4000 ppm) y peróxido de hidrógeno, en tratamientos solos o combinados, sobre la propagación por estacas del cultivar *Leucospermum* ‘Spider’ y profundizar en el conocimiento de las respuestas a nivel histológico que presentan las estacas de dicho cultivar sometidas a los tratamientos. Además, conocer a nivel de microscopía óptica (MO) y electrónica los caracteres estructurales de hojas y tallos (prototipo) de este mismo cultivar.

Para llevar a cabo esta experiencia se recolectaron estacas de madera semidura y se sometieron a los diferentes tratamientos, luego se plantaron en bandejas de propagación, con un sustrato compuesto por poliestireno y fibra de coco (3:1), y se colocaron en un invernadero automatizado de cristal, ubicado en la Sección de Ingeniería Agraria. Por otro lado, se seleccionaron tallos y hojas jóvenes y maduros (prototipo) para la obtención de muestras histológicas.

Al final del ensayo, los resultados de estacas trasplantables se sometieron a una prueba de hipótesis chi-cuadrado, mientras que, la longitud de las raíces y el índice de enraizamiento se sometieron al análisis de varianza y posterior separación de medias por el método de Duncan al nivel del 5%. Cuando las estacas presentaban raíz trasplantable se extrajeron del sustrato de propagación y se prepararon para el estudio histológico. Analizando estadísticamente los resultados obtenidos se puede concluir que el cultivar *L. ‘Spider’* puede propagarse, en las condiciones en que se realizó este ensayo, mediante el uso de IBA a una concentración de 2000 ppm.

A nivel histológico, las muestras prototipo presentaron las siguientes características: epidermis foliar y caulinar simple, cutícula lisa y delgada en hojas y tallos jóvenes, hojas anfiestomáticas, tricomas foliares simples y alargados en ambos tipos de hojas pero de variable ornamentación. Por otro lado, la aplicación de los tratamientos 2000 ppm de IBA, peróxido de hidrógeno + 2000 ppm de IBA y peróxido de hidrogeno + 4000 ppm de IBA, generó unos cambios anatómicos en los tallos, observados a MO, como fueron: una mayor actividad meristemática en la zona cambial y el córtex; alargamiento de los haces vasculares en los tratamientos con peróxido de hidrógeno + 2000 ppm de IBA y peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA, y un aumento del tejido esclerenquimático y células pétreas, cuya presencia no puede considerarse como barrera en la producción de raíces.

TITLE: VEGETATIVE PROPAGATION OF CULTIVATING LEUCOSPERMUM 'SPIDER', FAMILY PROTEACEAE. HISTOLOGICAL ANALYSIS

AUTHOR (S): Hernández, I., Vera Batista, M.C., Alfayate, M.C.

ABSTRACT

Keywords: *Leucospermum*, rooting, growth regulators, plant tissues, tissue structure.

This trial consisted in studying the influence of the concentration of IBA (2000, 4000 ppm) and hydrogen peroxide, in lone treatments or in combination treatments, on the propagation by cuttings of the cultivar of *Leucospermum* 'Spider' and delve into the knowledge of the responses at the histological level presenting the cuttings of such cultivar subjected to the treatments. Besides, distinguishing at an optical microscopy (OM) level and at an electronic level the structural characters of leaves and stems (prototype) of the same cultivar.

To carry out this experience, cuttings of semi-hard wood were collected and were submitted to the different treatments, then they were planted in propagation trays, with a substrate made of polystyrene and coco fibre (3:1), and were placed in a automated glass greenhouse, located in the Department of Agricultural Engineering. On the other hand, stems and young and mature leaves (prototype) for histological specimen collection were selected.

At the end of the trial, the results of transplantation cuttings underwent a hypothesis Chi-square test, while the length of the roots and the rate of rooting were subjected to analysis of variance and subsequent separation by the Duncan method at the level of 5%. When the cuttings had transplantable roots, these were extracted from the propagation substrate and were prepared for the histological study. Analyzing statistically the results obtained, we can conclude that the cultivar *L.* 'Spider' can spread in the conditions that were carried out in this trail, by the use of IBA in a concentration of 2000 ppm.

At a histological level, it can be concluded that the prototype samples presented the following features: simple leaf and cauline epidermis, smooth and thin cuticle in young leaves and stems, and the thickness increased in mature leaves and stems, anfiestomaticas leaves, simple and elongated foliar trichomes in both types of leaves but of variable ornamentation. On the other hand, the application of the treatments 2000 ppm of IBA, hydrogen peroxide + 2000 ppm of IBA and hydrogen peroxide + 4000 ppm of IBA, generated a series of anatomical changes in the stems, observed by OM, as were: a greater meristematic activity in the cambial area and in the cortex; lengthening of the vascular bundles in those treatments with hydrogen peroxide + 2000 ppm of IBA and hydrogen peroxide + 4000 ppm of IBA, and an increase of the sclerenquimatic tissue and stone cells, whose presence cannot be considered as a barrier in the root production.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

El término protea es usado para designar comercialmente las plantas que pertenecen a la familia Protaceae, algunos de cuyos miembros se cultivan para flor cortada y por su follaje. Esta familia incluye unos 80 géneros y 1.700 especies de arbustos o árboles con inflorescencias compuestas y que producen principalmente aquenios, folículos o frutas drupáceas. Las más cultivadas pertenecen a cinco géneros: *Leucadendron*, *Leucospermum* y *Protea* (originarias de Sudáfrica especialmente), *Banksia* y *Telopea* (originarias de Australia). Se producen principalmente en el hemisferio sur: Sudáfrica, Australia, Nueva Zelanda, Zimbabwe; y hemisferio norte: Israel, California, Hawái, Portugal y España, principalmente, en Canarias.

Las proteas requieren un clima mediterráneo, siendo poco exigentes en cuanto a riegos y fertilización, por lo que es recomendable como una alternativa interesante, en estos momentos, para las zonas de medianías de Canarias, comprendidas entre los 400 y 900 metros sobre el nivel del mar (msnm).

El cultivo de proteas en Canarias es relativamente reciente, se inició a mitad de la década de los 80. Los géneros cultivados por su interés en los mercados europeos, Canadá, EE.UU. y Japón son, fundamentalmente, *Leucadendron*, *Leucospermum* y *Protea*. Los cultivos están repartidos en 3 islas, Tenerife, Gran Canaria y, principalmente, La Palma; ocupando una superficie aproximada de 60 ha, repartidas de la siguiente manera: 20 ha en Tenerife, 10 ha en Gran Canaria y 30 ha en La Palma (Suárez, 2015).

El género más cultivado es *Leucospermum*, cuya demanda es considerablemente alta en la época que discurren entre principios de otoño y mediados de primavera, por lo que Canarias, debido a su situación geográfica, produciría prácticamente en solitario en esas fechas todos los ejemplares que abastecen el mercado.

El principal inconveniente para este cultivo en las islas, son los suelos arcillosos y suelos calizos, ya que generalmente las proteas los prefieren arenosos, con buen drenaje. Este trabajo gira en torno al estudio del cultivar *Leucospermum* ‘Spider’ (*L. formosum* x *L. tottum*), seleccionado y nominado por VOPI (Vegetable and Ornamental Plant Institute, Sudáfrica) en 1975 y registrado en 1997 como patrón, muestra buena adaptabilidad a suelos arcillosos, utilizándose como patrón, obteniéndose buenos resultados, para cultivares de interés comercial como *Leucospermum* ‘Tango’ y *L.* ‘Sucesion I’.

En base a todo lo expuesto anteriormente, en este Trabajo de Fin de Grado, se pretendió estudiar la propagación por estacas de *Leucospermum* 'Spider' sometidas a distintos tratamientos. Asimismo, se ha realizado un estudio histológico a nivel de microscopía óptica y microscopía electrónica para conocer la estructura anatómica de este cultivar y poder responder algunas cuestiones que se nos plantean a lo largo de la investigación, ya que las condiciones medioambientales tiene una fuerte influencia en la estructura de hojas y tallos, así como para determinar de qué manera los tratamiento químicos influyeron en la formación de las raíces de las estacas.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Los objetivos que este Trabajo Fin de Grado (TFG) pretende alcanzar son los siguientes:

- a) Estudiar la influencia de IBA y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en tratamientos solos o combinados sobre la propagación por estacas del cultivar *Leucospermum* 'Spider' y, además, profundizar en el conocimiento de las respuestas a nivel histológico que presenten las estacas de dicho cultivar sometidas a los tratamientos.
- b) Estudiar, a nivel de microscopía óptica y electrónica, los caracteres estructurales de hojas y tallos (prototipo) de *Leucospermum* 'Spider'.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

III. 1. TAXONOMÍA, DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA

III. 1. 1. Familia Proteaceae

Proteaceae A. L. de Juss., Gen. Pl. 78 (1789) (*Protea*)

La familia Proteaceae, orden Proteales, es una de las más prominentes del hemisferio meridional, son angiospermas (plantas que presentan las flores y semillas cubiertas) pertenecientes a uno de los grupos más antiguos de las plantas con flor.

Esta familia la constituyen árboles o arbustos, raramente hierbas perennes. Hojas alternas o esparcidas, opuestas o verticiladas, generalmente muy coriáceas, enteras o divididas de diversas formas. Estípulas ausentes. Periantio carolino, tetrámero, valvado, con los tépalos comúnmente doblados o enrollados al abrir. Presentan cuatro estambres opuestos a los tépalos, normalmente insertos sobre ellos, inusualmente libres. Anteras generalmente con dos lóculos paralelos de apertura longitudinal. Glándulas o escamas hipóginas o periginas, normalmente 4 alternando con los filamentos, libres o unidas de muy diversa forma, a veces ausentes. Ovario súpero, unilocular. Estilo terminal sin dividir. Óvulos 1 o más unidos colateralmente o varios imbricados en las filas contiguas. Fruto en folículo leñoso o coriáceo, más o menos dehiscente, raramente en aquenio, o en cápsula bivalva o una drupa indehiscente. Semillas 1-2 o pocas, a veces aladas. Embrión recto con cotiledones carnosos y raíz corta (Hutchinson, 1959).

Raíces proteoides, formadas por pequeños manojos de miles de raicillas dispuestas a intervalos a lo largo de sus raíces normales (Sánchez de Lorenzo, 2005). Estas raíces no contienen micorrizas, pero realizan una función análoga, es decir, mejoran la absorción de nutrientes (Lamont, 1986). Como resultado, las plantas con este tipo de raíces, pueden crecer en suelos con escasa cantidad de nutrientes, como los suelos con deficiencia de fósforo, por lo que están presentes en plantas que son colonizadoras de ambientes xéricos.

Distribución y ecología

La familia Proteaceae se distribuye principalmente en África y Australia. Los géneros sudafricanos son *Leucadendron*, *Leucospermum*, *Protea*, *Serruria*, etc., y los australianos son *Banksia*, *Telopea*, etc., que incluyen un conjunto de especies de gran interés ornamental, tanto desde el punto de vista de la utilización de la flor cortada (fresca o seca) como del follaje. Para este grupo de plantas se ha generalizado el nombre de proteas.

La mayoría de las proteas sudafricanas se localizan en la región de El Cabo, formando parte del fynbos (matorral mediterráneo costero) que cubre las laderas de las montañas. El clima de estas regiones es, principalmente, mediterráneo o semimediterráneo, con inviernos suaves, época en la que, especialmente, se producen las lluvias. Las precipitaciones anuales varían entre 180 y 2500 mm. A lo largo de la costa sur, las precipitaciones invernales se complementan con algunas lluvias durante el verano, que aumentan en duración a medida que nos desplazamos hacia el este. Las temperaturas pueden descender hasta los 0°C en invierno.

Estas regiones presentan suelos variados, generalmente pobres, principalmente graníticos, de baja fertilidad, ácidos, bien drenados, sobre los que habitan la mayoría de las especies de proteas. Algunas pueden vivir en suelos arcillosos y otras en arena pura. También existen algunas que crecen sobre suelos alcalinos, con pH superior a 8 (*Leucospermum patersonii*, *Protea obtusifolia*) (Rodríguez Pérez, 2007).

Por otra parte, las especies comerciales del género *Banksia* se encuentran en las regiones semiáridas del sudoeste de Australia, cuyo clima es templado, con largos y cálidos veranos e inviernos suaves, mientras que *Telopea speciosissima* es nativa de Nueva Gales del Sur, de regiones de abundantes precipitaciones.

Los suelos donde habitan las proteas australianas son, generalmente, arenosos o pedregosos, escasos en nutrientes.

III. 1. 1. 1. Género *Leucospermum*

Leucospermum R. Br en Trans. Linn. Soc. Lond. 10:95 (1810), - nom. Cons.: Roem. & Schult. Syst. Veg. 3:356 (1818);- Sprangel, Syst. Veg. 1:464 (1825): & Shult., Mamt. Syst. Veg. 3:266 (1827);- Endlincher, Gen. Pl. fasc. 5: 337 (1837);-Harv., Gen. S. Afr. Pl.,; 291 (1838);- Meisn. En DC., Prodr. 14:253 (1856): Benth. & Hook., Gen. Pl 3:170 (1883);- Engler en Nat. Pfl. Fam. 3 (1):137 (1888);- Phillips & Stpf en Fl.

Cap. 5:610 (1912);- Thonner, Fl. Pl. Afr.: 171,t.33 (1915);- Phillips, Gen. S. Afr. Fl Pl. e d 2,:257 (1951) Hutch., Gen. Flo. Pl. 2:292 (1967). Tipo: *L. hypohyllocarpodendron* (L) Druce.

Conocarpus Adanson, Famil. de Plant. 2:284 (1763), parcialmente según citación de Boerh. T. 196 & t.198;-non L. (1753).

Lepidocarpus Adason, Famil. de Plan. 2:284 (1763), parcialmente según citación e Plunk. Phyt. t. 200 f.2.

Leucadendron O. Kuntze, Rev. Gen. Pl.2:578 (1891); - non L. (1753).

Arbustos provistos de un único tallo o con múltiples tallos desde la base, poseen una altura de 1-5 m, o son arbustos postrados, extendidos y con tallos decumbentes, de 1-5 m de diámetro. Hojas alternas laxamente ascendentes o imbricadas, sésiles o pecioladas, de 1,5-14 cm de longitud, elípticas o lineales, oblongo lanceoladas, ovales, obovadas o espatuladas; enteras o con hasta 17 dientes en el ápice, glabras, pubescentes, con mucha frecuencia recubiertas de un indumento corto de pelos finos, crispados, entremezclados con tricomas erectos, sedosos. Inflorescencia dispuesta en capítulos axilares, sésiles a pedunculadas, solitarias o en grupos de hasta 10 por rama florífera, globosas o globoso-deprimidas, de 2-15 cm de diámetro. Receptáculo involucro cilíndrico, cónico, globoso o aplastado. Brácteas involucrales lineares u ovadas, subescarrosas, cartilaginosas o membranosas, glabras o pubescentes, pequeñas verdosas inconspicuas cuando están frescas. Bractéolas lanosas en la base, pubérulas o glabras apicalmente que, ocasionalmente, pueden agrandarse y hacerse leñosas después de la polinización, con un perianto de 1,5-5,5 cm de longitud, tubular- cilíndrico en botón, recto o adaxialmente curvado, de colores blanco, rosa, amarillo, naranja o escarlata, con tres uñas adaxiales unidas para formar una vaina. La uña adaxial únicamente unida en la base a otras tres. Tubo del perianto de 0,3-1,0 cm de longitud, cilíndrico o angosto en la base e inflado en el ápice. Limbos del perianto ovados o lanceolados, agudos. Anteras sésiles o subsésiles, con el conectivo prolongado en una protuberancia apuntada o redondeada. Estilo recto o curvado adaxialmente o recto, de 1-8 cm de longitud, alargándose rápidamente y arqueándose hacia arriba entre las tres uñas fusionadas y la uña libre, a menudo ahusado subterminalmente. El presentador de polen es de forma cilíndrica, ovoide, cónica y oblicuamente turbinada. La hendidura estigmática es terminal u oblicua. Ovario de 1-2 mm de diámetro pubérulo, escasamente desde la base del estilo, unilocular, con un solo óvulo, péndulo. Escamas hipóginas 4, de 1-3 mm de longitud, lineares a deltoide - subulada. Frutos en aquenio, ovoides a cilíndricos, de 4-8 mm de longitud, ampliamente emarginados en la base, glabros o diminutamente pubescente (Rourke, 1972).

Distribución y ecología

El género *Leucospermum* comprende, aproximadamente, 48 especies distribuidas por Sudáfrica. Su ubicación se extiende desde las tierras altas de Zimbabwe, a través de la parte oriental de Transvaal Drakensberg hasta Zwaziland a Natal, y desde allí, se distribuye a lo largo y ancho del cinturón costero del este y sudoeste del Cabo, hasta el sudoeste de dicha provincia, con algunas poblaciones apartadas en Naqualand. Únicamente tres especies (*L. saxosum*, *L.*

gerrardi y *L. innovans*) se encuentran fuera de los límites del Cabo, mientras que el 92% de las especies conocidas se encuentran en Port Elizabeth y en la desembocadura del Oliphants River. La mayor parte de las especies se concentran en un cinturón a lo largo de la costa sur del Cabo, entre Stanford y la desembocadura de Breede River, donde se encuentra, aproximadamente, el 30% de las especies conocidas. Los rangos geográficos de la mayoría de las especies son pequeños, pudiendo darse el caso de que muchas de ellas se ubiquen en una milla cuadrada (2,59 Km²). Son pocas las especies que dispongan de rangos más amplios de distribución. Es por ello que en muchos aspectos, la distribución de *Leucospermum* es paralela a la de diversos géneros típicos del Cabo, como *Phyllica*, *Muraltia*, *Cliffortia* y *Ariste*.



Fotografía 1.- Mapa de Sudáfrica (Continente africano).

(Fuente: Didactalia)

Los suelos en que se desarrolla la mayor parte de las especies en el Cabo son de tipo muy ácido, derivados de areniscas procedentes de Table Mountain. Son pocas las que se desarrollan sobre sustrato silíceo proveniente de la descomposición de cuarcitas lavadas. Fuera de los límites del Cabo, las especies se encontrarán sobre suelos derivados de areniscas y cuarcitas.

Hay diversas especies que viven sobre suelos pesados arcillosos, como es el caso de *L. grandiflorum* y *L. lineare*. También se puede dar el caso de que vivan sobre arenas parcialmente estabilizadas, de origen terciario o de reciente formación (Rourke, 1972).

III. 1. 1. 1. 1. Descripción parental

III. 1. 1. 1. 1. 1. *Leucospermum formosum*

Originaria de Sudáfrica, estrechamente relacionado con *L. catherinae*, esta especie está formado por arbustos de gran tamaño, erectos de hasta 3 metros de altura. Hojas elíptico-lanceoladas, cubiertas con una densa capa de pelo gris, fino, crispado, 65-100 mm de largo y 14-20 mm de ancho, constituidas por tres dientes glandulares en el ápice; además, carecen de peciolo.

Las cabezas florales son grandes y vistosas. Inflorescencia con forma de turbante a deprimida forma de disco, 150 mm de ancho, solitaria, o en grupo de 2 a 3; tallo 10-20 mm de largo. Brácteas involucrales ovaladas, fuertemente cerrando el tallo, delgadas y de textura como el papel, veloso y con un fleco. Perianto de 50 mm de largo, amarillo oro y tubo de 10 mm de largo. Estilo progresivamente curvado alejado del centro después de la apertura, 70-80 mm de largo, torcido en el sentido de las agujas del reloj cerca de la punta, amarillo claro pero ámbar con un rubor bronce cuando madura. Presentador de polen casi cilíndrico, con ápice apuntando, curvado en el sentido de las agujas del reloj con correcto ángulo del estilo, blanco pero rosado cuando madura.

La población de *Leucospermum formosum* se distribuye a través de las montañas Riviersonderend, Langeberg y las montañas Outeniqua desde Dassieshoek hasta Duiwelskop.

Habita generalmente en zonas frescas y laderas de la zona sur sobre suelo de turba, 200-1000 m. Requiere de lugares soleados, con circulación de aire libre, buen drenaje, suelo ácido y agua moderada durante todo el año. De esta especie sólo se conocen unas pocas poblaciones aisladas y se enfrenta a un riesgo muy alto de extinción en estado silvestre, ya que están amenazadas por la reforestación o la agricultura.

Florece en los meses de otoño, entre septiembre y octubre. Los frutos se desarrollan 1-2 meses después de la floración, son pequeños y están recubiertos por una piel blanca, suave y carnosa. Se pueden propagar por semillas o esquejes.



Fotografía 2.- Cabezas florales de *L. formosum*.
(Fuente: Colin Paterson-Jones y Kirstenbosch National Botanical Garden)



Fotografía 3.- Porte de *L. formosum*.
(Fuente: Alamy Stock Photo)

III. 1. 1. 1. 1. 2. *Leucospermum tottum*

Leucospermum tottum (L.) R. Br. En Trans. Linn. Soc. Lond. 10:97 (1810); Phillips & Stapf en Fl. Cap. 5:621 (1912); Vogts en Flower. Pl. S. Afr. 35:5. 1380 (1962).

Protea totta L., Mant. Alt.: 191 (1771). Tipo: “Montañas Roode Zand, 3 pies matorrales, fl. agosto”, Tulbagh s.n. pliego número 116. 35 (LINN).

Protea lotta L., Poir. En Lam., Encycl. Meth. Bot. 5:644 (1804), “totta”.

Leucadendron tottum (L.) O. Kuntze, Rev. Gen. Pl. 2:579 (1891).

Leucadendron horizontale Salisb. ex Knight en Knight, Cult. Prot.: 53 (1809), -nom. superfl.

Originaria de Sudáfrica. Arbusto erecto, bastante ramificado, de 1-2 m de diámetro, formado únicamente por un tronco y ramas extendidas algo horizontalmente. Ramas floríferas dispuestas horizontalmente, de 5-7 mm de diámetro, finamente pelosas a glabras, teñidas de rojo. Hojas ampliamente espaciadas, patentes, sésiles, glabras, lanceolado-agudas a oblongo-lineares, raramente cordadas en la base, de 0,5-1,5 cm de ancho y 2,5-6 cm de largo, con el ápice usualmente entero, ocasionalmente con 2-3 dientes. Inflorescencias usualmente solitarias, ampliamente cónico-deprimidas, haciéndose discoidales al abrirse, de 9-15 cm de diámetro, pedunculadas, con el pedúnculo de 2-3 cm de longitud. Receptáculo involucrel estrechamente cónico, de 3-4 cm de largo y 4mm de ancho. Brácteas involucrales anchamente ovadas a ovado-acuminadas, de 4-7 mm de anchura y de 1-1,5 cm de longitud, en 2 alas membranosas en la parte basal, glabras pero con márgenes ciliados, patentes a muy laxamente imbricadas. Bractéolas anchamente ovadas, de 15 mm de largo y 8 mm de ancho, blandamente membranáceas, lanosas basalmente, pubérulas a glabras y acuminadas apicalmente. Perianto de 4-4,5 cm de longitud, de color rosa pálido. Tubo del perianto de 7 mm de largo, glabro a muy esparcidamente peloso, ligeramente comprimido lateralmente. Uñas del perianto de 1 mm de anchura, finamente pelosas, las tres uñas adaxiales unidas en una vaina, haciéndose muy apretadamente enrollada, al abrirse, en la región subterminal. Limbos del perianto ovados, de 3 mm de longitud y 1,5 mm de anchura, de color carmín oscuro a marrón, esparcidamente tomentosos. Anteras subsésiles, ovadas a lanceoladas, de 2 mm de largo. Estilos de 5 cm de longitud, ligeramente curvados adaxialmente, haciéndose rectos con la edad, eventualmente proyectándose en ángulo recto con el receptáculo. Presentador de polen ovoide-aguso, de 1-1,5 mm de diámetro, con la superficie adaxial oblicua y la hendidura estigmatica terminal. Escamas hipogíneas subulado-lineares, de 2 mm de largo, hialinas (Rourke, 1972).

Su rango de distribución se extiende desde Cedarberg, a través de las montañas de Cold Bokkeveld, Ceres, Tulbagh y Worcester, a las de cerca de Paarl y Villiersdorp, en la Republica de Sudáfrica (Rourke, 1972).

Sin contar unas pocas poblaciones densas cerca de Tulbagh y Villiersdorp, *Leucospermum tottum* tiende a ser una especie algo solitaria. Los pequeños grupos o individuos dispersos viven en terrenos montañosos a elevaciones de 300- 2000 m.

El rango de hábitats ocupados puede variar desde emplazamientos cálidos y secos orientados al Norte, en Cedarberg, recibiendo una precipitación anual de 375-500 mm, a otros frescos, húmedos, orientados al Sur, donde la lluvia anual puede ser de hasta 1500 mm.

La floración tiene lugar de septiembre a enero. Los frutos se desarrollan, normalmente, 1-2 meses después de la floración.



Fotografía 4.- Cabeza floral de *L. tottum*.

(Fuente: http://lavr.tk/wp-content/uploads/2015/04/Leucospermum_tottum.jpg)



Fotografía 5.- Porte de *L. tottum*.

(Fuente: Andrew Massyn)

III. 1. 1. 1. 2. *Leucospermum* ‘Spider’

Leucospermum ‘Spider’ (código número T751102) es un cultivar originado por el cruce de *Leucospermum formosum* x *Leucospermum tottum*. Seleccionado y evaluado por VOPI (Vegetable and Ornamental Plant Institute, Sudáfrica) en 1975 y registrado en 1997 como patrón de *Leucospermum*, ya que presenta las siguientes características (Van der Merwe et al., 1991): Buena compatibilidad con otros cultivares, buena actitud frente a las técnicas de injerto sobre estacas no enraizadas, tolerancia a *Phytophthora* y su uso podría suponer un incremento de la producción de numerosos cultivares en suelos atípicos (suelos arcillosos).

La selección de patrones es una medida imprescindible para lograr una mejor adaptabilidad, a diversos suelos, así como para tener una mejor producción de plantas de *Leucospermum* (Van der Merwe, 1885). En este sentido se recomienda el injerto sobre patrones como *L. patersonii*, cuando se presentan problemas en suelos calizos (Brits, 1984).

Este cultivar ha sido usado por numerosos productores comerciales de Sudáfrica desde hace mucho tiempo como patrón, (Brits, 1992) debido a que presenta un alto grado de tolerancia a *Phytophthora cinnamomi* como se demostró en los resultados de una investigación realizada con 19 especies y varios híbridos.

En una experiencia previa se estudió la propagación por estaca de este cultivar en dos condiciones ambientales distintas (invernadero y umbráculo), previamente tratadas con diferentes concentraciones de IBA, que dio como resultado un 100% de estacas trasplantables a las 12 semanas desde el inicio del ensayo, en ambas condiciones ambientales, con 2000 ppm de IBA y empleando como medio de enraizamiento una mezcla de turba y poliestireno (4:6, en volumen) (Santana, 2012).

La flor de este cultivar es de color salmón y hojas verdes. Además presenta un tallo con un tamaño de 25-80 cm.



Fotografía 6.- Diferentes estadios de apertura de una inflorescencia de *L. 'Spider'*.



Fotografía 7.- Cultivo de *Leucospermum 'Spider'* en la Sección de Ingeniería Agraria de la Escuela Politécnica Superior de Ingeniería, de la Universidad de La Laguna.

III. 2. PROPAGACIÓN VEGETATIVA DE PROTEAS

Inicialmente las plantaciones comerciales de proteas se establecieron utilizando plantas obtenidas de semilla, sin embargo no cumplían con las características necesarias para los mercados de flor cortada, debido a la falta de uniformidad y escasa calidad de la producción floral, debido a la gran variabilidad morfológica en cuanto a longitud de los tallos florales, tamaño y color de la flor, etc. Por estos motivos, actualmente las plantaciones comerciales se realizan utilizando plantas procedentes de estacas de cultivares selectos, es decir, mediante la propagación vegetativa (Rodríguez Pérez, 2007).

La propagación vegetativa o asexual consiste en utilizar partes vegetativas (tallos, raíz, hoja u órgano especializado) de la planta madre (planta donadora) y producir una planta que posea el mismo genotipo que ésta. Esto es posible porque todas las células de una planta poseen la información necesaria y/o suficiente para reproducir la planta entera (Hartmann et al., 1992).

Para este tipo de propagación se utilizan diversas técnicas como son: estaquillado, acodo, injerto, y otras técnicas que han surgido últimamente. Las estacas de tallo y los acodos serán capaces de formar raíces adventicias, las de raíz podrán regenerar un nuevo sistema radicular, mientras que los esquejes de hoja dan lugar tanto a raíces como a tallos nuevos (Hartmann et al., 1989).

Además de obtener plantas de buena calidad comercial, la ventaja principal que posee este sistema es la de obtener plantas nuevas en un espacio corto de tiempo, con respecto a la propagación sexual (por semilla).

Según Hartmann et al. (1990) y, más tarde, Vogts (1982) es necesario este tipo de propagación en las especies de la familia Proteaceae en los siguientes casos:

- Por razones económicas, debido a que la propagación de algunas especies por semillas es difícil y poco rentable.
- Para evitar períodos juveniles, haciendo que las plantas florezcan antes (que cuando se desarrollan por semillas).
- En todos los cultivares e híbridos, incluso si producen semillas viables, ya que pueden dar lugar a características no deseadas.
- En especies extrañas o en peligro de extinción, donde la fuente de obtención de semillas sea muy escasa.

III. 2. 1. Propagación por estacas

Este tipo de propagación se emplea para la obtención de plantas de cultivares que luego se utilizarán en el establecimiento de plantaciones comerciales. De esta manera se obtiene una floración regular, uniforme y las plantas empezarán a producir usualmente un año antes que las procedentes de semilla (Rodríguez Pérez, 2007).

Este sistema consiste en separar un fragmento de una planta (tallos, raíz, hoja u órgano especializado) y colocarlo en unas condiciones favorables que conlleven la regeneración de una planta completa (Martínez y Águila, 1989).

Este método tiene numerosas ventajas, como son:

- De pocas plantas madres se pueden obtener una gran cantidad de plantas nuevas.
- Es un sistema rápido, sencillo y económico.
- La variabilidad genética con respecto a la planta madre es muy reducida, no habiendo cambios genéticos (Hartmann et al., 1990).

El éxito de este sistema viene condicionado por una serie de factores, como por ejemplo: el tipo de estaca utilizado, su elección y obtención; las condiciones medioambientales en que se desarrolle la propagación; las medidas sanitarias y los tratamientos físicos o químicos que se apliquen.

III. 2. 1. 1. Tipos de estacas

Según la zona de la planta madre de donde se extraigan las estacas se pueden clasificar en varios tipos: estacas de tallo, estacas de raíz, estacas de hoja y estacas de yema y hoja.

III. 2. 1. 1. 1. Estacas de tallo

Son las más recomendadas para la propagación de proteas. Según Martínez y Águila (1989) y Hartmann et al. (1990) se pueden dividir en cuatro tipos, según el grado de lignificación que presenten las mismas:

- **Estacas de madera herbácea:** Son estacas procedentes de plantas herbáceas y suculentas. Normalmente se podrán enraizar con bastante facilidad durante todo el año.

- **Estacas de madera blanda:** Son las que se toman de plantas leñosas caducas o perennes a partir de las ramas procedentes del último crecimiento de primavera. Enraízan con cierta facilidad y rapidez, aunque requieren muchos cuidados.
- **Estacas de madera semidura:** Se obtiene de especies leñosas perennes o caducas. Se recolectan en verano, cuando presentan ramas nuevas, justo después de que ha habido un período de crecimiento, sin estar en la fase activa de alargamiento, cuando la madera está parcialmente madura. Este tipo de estacas es la más empleada en la propagación vegetativa de proteas.
- **Estacas de madera dura de especies perennes:** Estas son lentas de enraizar. Las estacas se recolectan en otoño y finales de invierno, de madera procedente del año anterior, aunque a veces se puede utilizar material más viejo. Según Martínez y Águila (1989) el lesionado de las estacas puede dar buenos resultados.
- **Estacas de madera dura de especies caducas:** En este caso, las estacas se obtienen de la planta madre cuando ésta se encuentra en período de reposo, por lo que están desprovistas de hojas, al final de otoño, en invierno o al principio de primavera. Lo más usual es utilizar madera del año anterior, aunque en determinadas ocasiones también se pueden usar de otros años, al poseer mayores reservas nutricionales. La mejor zona para escoger las estacas son las de la parte media y basal de las ramas. No deben poseer entrenudos muy largos y los fragmentos que se utilicen deben de llevar como mínimo dos nudos.

III. 2. 1. 1. 2. Estacas de raíz

Con este tipo de estacas los mejores resultados se obtienen si se utilizan las secciones de raíz de plantas jóvenes, a finales de invierno o principios de primavera, cuando las raíces están provistas de alimentos almacenados, pero antes de que se inicie el nuevo crecimiento (Hartman y Kester, 1989).

III. 2. 1. 1. 3. Estacas de hoja

Se utilizará el limbo de la hoja o del peciolo para obtener nuevas plantas. El número de plantas que se pueden multiplicar de esta forma es relativamente reducido y el éxito de la técnica está en función de diversos factores ambientales, así como de la madurez de la hoja (MacMillan, 1990).

III. 2. 1. 1. 4. Estacas de hoja y yema

Según Hartmann y Kester (1989) este tipo de material se constituye de la lámina de una hoja, una yema axilar y una pequeña porción de tallo. La hoja será la que aporte los nutrientes para el sustento del individuo y para los procesos necesarios regenerativos. La yema es el núcleo del nuevo sistema caulinar, y en la porción del tallo se producirán las raíces (MacMillan, 1990). Este tipo de estacas se debe hacer solamente en material que tenga las yemas bien desarrolladas y hojas sanas en crecimiento activo.

Las estacas de hoja con yema se han utilizado para propagar algunas proteas como son: *Telopea speciosissima* x *T. mongaensis* (Ellyard y Butler, 1985), *Leucadendron* 'Safari Sunset', *Leucospermum patersonii* y *Protea obtusifolia* (Rodríguez Pérez, 1992).

III. 2. 1. 2. Selección de las estacas

En la selección las condiciones fisiológicas en que se encuentren las plantas madres son muy importantes. Éstas deben estar sanas y libres de cualquier tipo de patógeno u enfermedad y, al mismo tiempo, deben presentar unas condiciones nutricionales adecuadas, ya que influye tanto en el porcentaje de enraizamiento como en el desarrollo de raíces y tallos de las estacas. La estaca o esqueje debe poseer buenas condiciones sanitarias, óptimas reservas de almidón y morfología vigorosa, generalmente debe proceder de material de la última brotación (Martínez y Águila, 1989).

El momento idóneo para la recolección de las estacas debe ser por la mañana, a primera hora, cuando el material vegetal está turgente, ya que hay una reducción del porcentaje de enraizamiento si la planta madre presenta carencia de agua en el momento de coger las estacas. De igual manera es importante la nutrición de la planta madre, ya que puede ejercer una fuerte influencia en el desarrollo de raíces y tallos de las estacas. Este efecto puede ser asociado con ciertas relaciones entre carbohidratos/nitrógeno, en el que el contenido de carbohidratos en la estaca influye en la iniciación radicular. Esta relación, generalmente puede determinarse por la firmeza del tallo. Una concentración baja de carbohidratos da como resultado estacas flexibles, mientras que con una concentración alta, las estacas son firmes y rígidas, rompiéndose cuando son dobladas; pero esa firmeza puede ser confundida por la debida maduración de los tejidos, ocasionada por el engrosamiento y lignificación de las paredes celulares (Hartmann y Kester, 1989).

En el caso de los carbohidratos, un contenido moderado de nitrógeno en los tejidos es ideal para lograr un enraizamiento óptimo. El contenido de nitrógeno muy bajo conduce a una

reducción del vigor, mientras que su abundancia produce un vigor excesivo. Es evidente que las plantas leñosas que son fertilizadas con unos niveles mínimos de nitrógeno enraízan mejor. Reducciones en la aplicación de nitrógeno tiene un doble efecto. Primero, el ratio de crecimiento es más lento. La reducción de nitrógeno ralentiza el crecimiento por la limitación en la biosíntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Posteriormente, hay un aumento en la cantidad de carbohidratos acumulados respecto a la de las estacas cogidas de plantas con altos niveles de nitrógeno. La producción de tejidos nuevos o, en este caso, la producción de nuevas raíces, requiere una gran cantidad de energía y esta reserva de carbohidratos puede servir como fuente de energía (Bachman, 2008). Para las plantas madres es aconsejable el equilibrio de bajo contenido en nitrógeno y alto contenido de carbohidratos para lograr un óptimo enraizamiento. No obstante lo anterior, no se puede decir que un contenido elevado de carbohidratos en las estacas esté invariablemente asociado con la facilidad del enraizamiento, pudiendo estar presentes otros factores que ejerzan una mayor influencia (Hartmann et al. 1990).

La existencia de hojas en las estacas parece que también juega un papel importante en el desarrollo de las raíces, ya que ésta aumenta el porcentaje de enraizamiento. Hess (1962) manifestó que las hojas promueven la aparición de un co-factor de enraizamiento que es responsable del aumento del enraizado en las estacas (Couvillon, 1988).

La época de recolección de las estacas es otro factor a tener en cuenta para un buen enraizamiento. Aunque en algunas, plantas la recolección de las estacas puede realizarse en cualquier época del año, existen periodos adecuados y otros que, por el contrario, resultan de bajo rendimiento al enraizar (Hartmann y Kester, 1989). En las especies de hoja caduca se recomienda la recolección de las estacas de madera dura en la época de reposo o bien, durante la época de crecimiento, se pueden preparar estacas con hojas de madera suave o de madera semidura. Las especies siempreverdes de hoja ancha o de hoja estrecha presentan, durante el año, uno o más periodos de crecimiento y se puede disponer de estacas en varios momentos del mismo, relacionadas con dichos periodos. Con frecuencia, los efectos de la época del año son meramente una respuesta de las estacas a las condiciones ambientales de las distintas épocas del año (Hartmann et al. 1990).

En proteas varios autores han ensayado la época de recolección de las estacas de diferentes especies y cultivares. La época del año en la que están disponibles los brotes adecuados para la preparación de la estaca, dependerá de la especie y de las condiciones climáticas, aunque de éstas últimas en menor medida. Algunas especies como *Leucospermum cordifolium*, *L. lineare*, *L. tottum* y sus híbridos, crecen activamente en primavera y verano (febrero-marzo en el hemisferio sur, agosto-septiembre en el hemisferio norte), deteniéndose al final del verano, siendo

ese el momento óptimo para la recolección y preparación de las estacas, ya que el material posee las condiciones adecuadas (Vera Batista, 2016). También se han obtenido buenos resultados con estacas tomadas más tarde, hasta el mes de mayo, en el hemisferio sur (en el hemisferio norte, hasta el mes de noviembre) (Jacobs y Steenkamp, 1975).

La época del año para la recolección de las estacas es un factor importante en la producción de raíces adventicia de *Telopea speciosissima*, ya que existe una variación de la respuesta con la estación, de tal forma que cuando las plantas madres están en desarrollo vegetativo, las estacas responden mejor a los tratamientos hormonales (Worral, 1976).

La mejor época para coger las estacas depende de dos factores principalmente: la madurez que tenga la madera al final del ciclo vegetativo y el tiempo que necesiten las estacas para enraizar. El ciclo vegetativo de todas las proteas está comprendido en el período que va desde noviembre a final de abril (mayo-final de octubre en el hemisferio norte). Otras especies como *Protea grandiceps*, *P. magnifica* y *P. neriifolia*, poseen un enraizamiento lento, por lo que es recomendable recolectar dichas estacas en noviembre-diciembre (mayo-junio en el hemisferio norte), en cambio en el caso de otras especies como *Protea compacta*, *Protea cynaroides*, *Protea eximia* y *Protea repens*, que enraízan más rápidamente, se pueden tomar las estacas de enero-febrero (junio y julio en el Hemisferio Norte). Las estacas de las especies de *Leucadendron* y *Leucospermum* que tienen un ciclo vegetativo tardío y no tardan más de dos meses o dos meses y medio en enraizar se deben recolectar en marzo-abril (septiembre-octubre en el Hemisferio Norte) (Jacobs, 1983).

Para estacas del género *Leucospermum*, la recolección debe realizarse justo después de la mitad de verano, a partir de material activo (Harre, 1988).

Para Malan (1988) la propagación de proteas por estacas, la época más favorable para la recolección del material vegetal, es inmediatamente después de que las últimas hojas estén completamente expandidas, pero antes de que comience la floración.

Posteriormente, Malan (1992) indicó que en *Leucadendron* y *Serruria* los brotes terminales se desarrollan durante agosto (febrero en el Hemisferio Norte), y las estacas deben recolectarse un tiempo después como madera semidura. En el caso de los géneros *Banksia*, *Grevillea*, *Mimetes*, *Protea* y *Telopea*, los ciclos de desarrollo están menos sincronizados, por lo cual, todas las estacas no están necesariamente en un óptimo estado de desarrollo si se recolectan al mismo tiempo.

Faruchi et al. (1997), en su ensayo sobre la mejora en la propagación de *Protea obtusifolia* comprobaron que dos de sus clones (LK-1 y C-82), cuyas estacas fueron tratadas con 2000 ppm de IBA, mostraron un porcentaje de enraizamiento diferente según la estación de recolección. En la estación calurosa (junio-octubre), los porcentajes de enraizamiento fueron bajos, aumentaron en invierno y fue máximo en primavera.

En otro ensayo con dos cultivares de *Grevillea*, (*G.* ‘Coastal Dawn’ y *G.* ‘Poorinda Royal Mantle’) se comprobó de nuevo la estacionalidad de ambos. En *G.* ‘Poorinda Royal Mantle’ las aplicaciones de IBA incrementaron el porcentaje de enraizamiento en todas las estaciones excepto en verano. El porcentaje de enraizamiento de dicho cultivar con o sin IBA también fue más alto en verano y más bajo en invierno (Krisantini et al., 2003). Más tarde, Krisantini et al. (2006) manifestó que en *G.* ‘Royal Mantle’ la aplicación de IBA a baja concentración fue suficiente para promover significativamente un mayor porcentaje de enraizamiento en otoño, mientras que en otras estaciones se requirió concentraciones más altas de IBA. En *G.* ‘Coastal Dawn’, la aplicación de IBA sólo promovió el enraizamiento en otoño y primavera, no teniendo un efecto significativo en invierno y verano.

Para algunas proteas chilenas, con elevado potencial ornamental, la recolección en primavera o inicio del verano y tratadas con 250 a 500 ppm de IBA mostró notables resultados en la propagación de *Embothrium coccineum*. En el caso de *Gevuina avellana* se recomienda aplicar un tratamiento con 4000 ppm de IBA y que la recolección de las estacas sea en verano, para obtener resultados satisfactorios. (Seemann et al., 2013).

Oliveira et al. (2012), en un ensayo realizado con diversas especies y cultivares de los géneros *Leucadendron*, *Leucospermum* y *Protea* demostraron la importancia, entre otros factores, de recolectar las estacas en la época apropiada para lograr porcentajes de enraizamiento satisfactorios. Las estacas de *Leucadendron* ‘Safari Sunset’ recolectadas a principios del invierno y especialmente a comienzos de verano presentaron valores más altos de enraizamiento que las recolectadas a finales del invierno. En *Leucadendron discolor* las estacas recolectadas a finales de enero presentaron mayor porcentaje de enraizamiento que las recolectadas en febrero. Las estacas de *Leucadendron* ‘Inca Gold’ recolectadas a finales de enero y mediados de agosto, mostraron un alto porcentaje de enraizamiento. Las estacas de *Leucospermum* ‘Goldie’ recolectadas en otoño obtuvieron el mejor ratio de enraizamiento y mucho más rápido. Las estacas de *Protea* ‘Venus’ fueron recolectadas desde abril a mitad de agosto, consiguiendo los mejores resultados a finales de abril y mediados de mayo. En *Protea cynaroides* se obtuvo un 100% de estacas enraizadas cuando éstas se recolectaron a finales de mayo, en *Protea* ‘Pink Ice’ a principios de diciembre -

mediados de enero. En el caso de las estacas de *Protea* ‘Susara’ se obtuvo el mejor porcentaje de enraizamiento a principios de febrero.

En un ensayo con cultivares de proteas se comprobó que el estado de desarrollo vegetativo influye de forma decisiva en el enraizamiento de los mismos. *Protea cynaroides* ‘Madiva’ y *Protea* ‘Pink Ice’ enraízan satisfactoriamente cuando las estacas se recolectan entre noviembre y mayo; *P. repens* ‘Sugar Daddy’ entre noviembre y marzo y *Protea* ‘Sylvia’ entre febrero y abril (Blomerus, 2014).

Otro factor determinante a tener en cuenta en la formación de raíces es, en las plantas difíciles de enraizar, la edad de la planta madre. Con frecuencia, las estacas de tallo o de raíz recogidas en la fase de desarrollo juvenil forman nuevas raíces con mucha más facilidad que aquellas tomadas de plántulas que están en la fase adulta de su desarrollo.

La relación de la juvenilidad con el crecimiento de las raíces tal vez se pueda explicar por el aumento en el establecimiento de inhibidores del enraizamiento a medida que la planta envejece. También es probable que la reducción del potencial de enraizamiento con la edad sea resultado de una reducción del contenido de compuestos fenólicos. Se ha postulado que los compuestos fenólicos actúan como cofactores o potenciador de la auxina en la iniciación de raíces. En ciertas plantas se observó que el contenido de fenoles era menor en las formas maduras que en las juveniles (Hartman et al. 1990).

Faruchi et al. (1997), ensayaron algunos métodos para mejorar el enraizamiento de estacas de *Protea obtusifolia*. Para ello se emplearon diversos tratamientos hormonales, estaciones, tratamientos de las plantas madres y diferente edad fisiológica de las estacas (plantas madres de un año y 8 años). Los resultados mostraron que las estacas derivadas de plantas de 1 año de edad enraizaron en un porcentaje mucho mayor que las recolectadas en plantas maduras.

Kesari y Krihnamachari (2008) estudiaron el efecto de las auxinas en el enraizamiento de estacas de tallo de *Pongamia pinnata* (L.), y concluyeron que las estacas que provenían de plantas jóvenes obtenidas de semilla lograron un elevado porcentaje de enraizamiento en comparación con las estacas recolectadas de plantas maduras en campo.

En un estudio realizado por Amri et al. (2010), para determinar el protocolo más adecuado en la propagación vegetativa de *Dalbergia melanoxylon*, evaluando varios aspectos tales como edad de la planta madre, tratamientos con IBA y posición de la estaca. Los resultados obtenidos respecto a la edad de la planta madre ultimaron que las estacas recolectadas de planta juveniles

obtuvieron mejores resultados en todos los parámetros de enraizamiento que las estacas tomadas de plantas maduras.

III. 2. 1. 3. Obtención y preparación del material vegetal

Al efectuar la separación de las estacas de la planta madre debe hacerse con un corte limpio y recto, con ayuda de una navaja u otro instrumento cortante. El corte basal debe situarse justo por debajo de un nudo.

Generalmente, las estacas deben tener como mínimo dos nudos, excepto las estacas de hoja con yema. La longitud de las estacas es muy variable en relación con la de los entrenudos que la constituyen, oscilando entre 5 y 70 cm. Las estacas apicales se obtienen por pinzamientos o corte de los extremos de las ramas o tallos. Las estacas intercalares son fragmentos tomados de la parte media o basal de las ramas por troceado. En los intercalares, el corte superior debe realizarse por encima de un nudo (Martínez y Águila, 1989).

En este tipo de estacas se suele eliminar las hojas basales del esqueje para evitar el contacto con el sustrato húmedo y su podredumbre. Para disminuir la transpiración y a su vez aumentar la densidad de plantación, además, a veces, se suprimen las hojas o se recortan parcialmente. Estas operaciones para reducir la transpiración son adecuadas siempre y cuando no se realicen con exceso, puesto que se limita la actividad fotosintética (Martínez y Águila, 1989).

Para proteas, varios autores han dado diversas normas para la obtención y preparación de las estacas:

- Las estacas deben prepararse y colocarse en las camas de propagación tan pronto como sea posible después de la recolección. Sin embargo, si esto no pudiese ser, se podría almacenar dentro de bolsas de plástico en un lugar frío (Meynhardt, 1974).
- Jacobs y Steenkamp (1975), manifestaron que la longitud de la estaca debe estar comprendida entre 10 y 20 cm, ya que, si son de mayor longitud, no solo enraízan con más dificultad, sino que su supervivencia es menor después del trasplante. Se suprimirán las hojas de la parte basal hasta la mitad o los dos tercios de la longitud de la estaca. En ciertas especies como *Leucospermum lineare*, las hojas se pueden eliminar a mano, pero en otras como *L. cordifolium*, se deben de cortar, ya que si no se podría estropear la corteza. El corte basal debe ejecutarse justo debajo de un nudo en especies con entrenudos

largos, como *Protea longiflora*, mientras que en especies con entrenudos cortos, como *Protea aristata*, se puede realizar el corte al azar.

- Jacobs (1983), señaló que longitudes mayores de estacas (45-55 cm), se utilizan generalmente para incrementar el sistema foliar de la estaca por encima del nivel del suelo, permitiendo de esta manera la penetración de los tratamientos químicos que se apliquen al suelo. En especies de hojas largas, éstas se reducen a la mitad antes del tratamiento hormonal, para conseguir un destacado uso del área de enraizamiento y que la luz llegue a las hojas más bajas.
- Malan (1989), da una serie de recomendaciones para la obtención y preparación de estacas de proteas. La estaca debe recogerse a primera hora de la mañana, guardándose en frío hasta que se prepare y se coloque en el sustrato. Una buena forma de desinfección es mojar las estacas cuando llegan de la plantación en captan (2 g/l) y benomilo (2 g/l), y dejarlas que se sequen. Una vez estén secas, se eliminan las hojas de la mitad inferior, si se arrancan, puede causar profundas lesiones en la corteza de la estaca, por lo que debe cortar cada hoja de forma individual con unas tijeras.

III. 2. 1. 4. Factores que influyen en el enraizamiento de las estacas

El enraizamiento de estacas es complejo sin un control adecuado de las condiciones ambientales, debido a que sin dicho control, el enraizamiento puede ser un completo fracaso, además también influyen diferentes tratamientos tanto físicos como químicos que pueden aumentar considerablemente el éxito del enraizamiento.

III. 2. 1. 4. 1. Condiciones ambientales

El éxito en el enraizado va a depender de las condiciones del medio ambiente donde se lleve a cabo la multiplicación. Los factores que van a contribuir son especialmente:

1. Elevada humedad relativa en la atmósfera.
2. Adecuada temperatura del sustrato y del aire.
3. Buena disponibilidad de aire y de agua en el sustrato.
4. Renovación del aire que permita un buen intercambio de gases.
5. Correcta iluminación.

III. 2. 1. 4. 1. 1. Humedad relativa

Como las estacas de tallo no poseen raíces que les permitan sustituir el agua perdida por transpiración, las condiciones de humedad relativa y disponibilidad de agua deben ser máximas, ya que si no, las estacas se desecarían y morirían antes de producir raíces. Para mantener una humedad relativa alta y máxima disponibilidad de agua, se puede recurrir a una aspersión intermitente de niebla o “mist system”.

Este sistema consiste en establecer una nube de gotas muy pequeñas de agua sobre las camas de propagación, de este modo se crea un ambiente alrededor de los esquejes de niebla, que conserva la humedad relativa a niveles altos. Con esto se consigue que la estaca esté continuamente cubierta de una delgada capa de agua que elimina o disminuye fuertemente la transpiración, manteniendo el ambiente a humedades relativas entre el 90 y 99%. Además se evita el aumento de temperatura de las hojas y del aire por la propia planta y a su vez puede inducir la síntesis de sustancias que fomentan el enraizamiento.

Generalmente, se emplean nebulizadores que aportan niebla al proyectar el agua a media presión (de 6 a 12 atmósferas). Los nebulizadores se suelen situar a 1 metro de altura sobre las estacas, de esta manera la nube de agua formada, cae lentamente sobre las estacas constituyendo una delgada capa de agua, que se irá evaporando en función de la temperatura, la radiación solar y la humedad relativa del aire.

La nebulización puede ser continua o intermitente, aunque se ha demostrado que la nebulización continua presenta importantes desventajas, como son: riesgo de asfixia radicular, mayor gasto de agua, enfriamiento excesivo del sustrato, etc. La cantidad de agua que debe añadirse dependerá de diversos factores como el genotipo de la planta, humedad del aire y temperatura.

Para Hartman et al. (1990) un factor a tener en cuenta es la calidad del agua para el “mist system” y el riego, al influir ésta en el enraizamiento. El agua con alto contenido en sales de calcio y magnesio puede ser bastante satisfactoria, pero el agua rica en sales como carbonatos, bicarbonatos o hidróxidos de sodio o potasio puede ser perjudicial, agravándose el problema cuando esto se asocia con contenidos bajos en calcio y cuando el medio de enraizamiento contiene turba u otro material de alta capacidad de intercambio. Es importante que el agua esté libre de cualquier tipo de patógeno.

Para que la transpiración disminuya e impedir que el agua se evapore, permaneciendo un largo tiempo en la superficie de la hoja, se emplea el “fog system”. Este sistema de humidificación

de alta presión (30-60 atmósferas) conduce el agua por una boquilla extremadamente fina, por la que sale en forma de niebla que conserva una atmósfera alrededor de la planta con una humedad relativa muy cercana a la saturación.

En proteas se ha venido empleando sistemas con microaspersores para mantener una humedad relativa adecuada y de este modo reducir la transpiración de las hojas de las estacas (Jacobs, 1983; Eliovson, 1983). El exceso de humedad es perjudicial para proteas (Vogts, 1982), por lo que estos sistemas deben actuar sólo a plena luz del día, desconectándose en días nublados y por las noches (Malan, 1988).

El funcionamiento del riego puede controlarse por medio de un sistema de hoja electrónica, por medio de un temporizador, tensiómetro o sensor de la humedad del sustrato o del aire próximo a las estacas. Lo más frecuente es el uso de un temporizador. En la Unidad del Fynbos (Sudáfrica) riegan con microjets cada hora, durante 3 minutos, entre las 7 y las 18 horas, durante los meses de verano. En invierno el tiempo de riego se acorta y se suministra entre las 9 y las 16 horas (Meynhardt, 1974; Jacobs y Steenkamp, 1975; Malan, 1992; Jefthas y Van der Berg, 1995; Rodríguez Pérez, 1993 y 1998).

III. 2. 1. 4. 1. 2. Temperatura

Es un componente fundamental en la rapidez de formación de las raíces, ya que los procesos que rigen el nacimiento de éstas son sustancias químicas y se conoce que una mayor temperatura, implica una mayor velocidad de reacción química, y por lo tanto una mayor velocidad de enraizamiento. Sin embargo, si la totalidad de la estaca se mantiene a una temperatura elevada, el ápice vegetativo se desarrollará también, empleándose los nutrientes de reservas principalmente para ese fin en lugar de la formación de raíces, de este modo, puede que las reservas se consuman antes de que la estaca sea autosuficiente.

Según MacMillan (1990), la estaca necesita dos temperaturas para lograr un buen enraizamiento: una temperatura que mantenga el medio aéreo fresco, manteniendo así un crecimiento apical mínimo, a la vez que se limita la transpiración y el gasto respiratorio aéreo, y una temperatura cálida en la base, para inducir la producción de raíces, al fomentar el transporte de materiales nutritivos orgánicos en la base de la estaca.

La temperatura óptima varía con las características del tallo y con su tendencia a deshidratarse. La temperatura ambiente óptima para la mayor parte de los esquejes es de 18-20°C para la formación y crecimiento de las raíces. La temperatura del sustrato debe mantenerse entre los 20 y 23°C, ya que temperaturas superiores a 26°C, aunque en algunos casos benefician el

enraizamiento, no son aconsejables, puesto que promueve el crecimiento de microorganismos que pueden provocar la podredumbre de las raíces (Martínez y Águila, 1989).

Para originar esta diferencia de temperatura entre la parte aérea y la parte basal de la estaca se suele colocar algún tipo de calor artificial, en las camas de propagación. La temperatura del calor de fondo debe ser constante, y para regularse se sitúa un termómetro en una de las bandejas, hasta el nivel de la base de las estacas. La temperatura debe ser observada constantemente, sobre todo al principio, ya que temperaturas muy altas de enraizamiento, incluso en períodos cortos, puede ocasionar la muerte de la estaca.

En muchas especies de proteas se ha comprobado que aplicando calor de fondo a una temperatura de 22-24°C, mejora significativamente el porcentaje de enraizamiento de las mismas. En el caso de *Protea repens* un fallo en el sistema de calor de fondo es suficiente para que se ennegrezcan sus hojas (Jacobs, 1983).

Para estacas de *Leucospermum cordifolium* se empleó una temperatura de 21°C (Parvin et al., 1973).

Brits (1986), contempló que el estudio de las temperaturas de las camas de enraizamiento para los distintos cultivares de *Leucospermum* era imprescindible a la hora de propagar las estacas de las mismos. Para ello empleó camas de enraizamiento con calor y sin calor de fondo con temperatura de $23 \pm 0.8^\circ\text{C}$ y $12.7 \pm 2^\circ\text{C}$ respectivamente, concluyendo que es necesario conocer previamente las necesidades térmicas, sobre todo en aquellos cultivares en los que no se les va a suministrar calor de fondo, para lograr un buen enraizamiento de las estacas.

Malan (1988), aconseja emplear calor de fondo con una temperatura de 22-25°C a la hora de propagar estacas de proteas.

Rodríguez Pérez et al., en sus experimentos realizados con especies y cultivares del género *Leucadendron* (1993), *Leucospermum* (2014), y *Protea* (2009, 2011) emplearon calor de fondo a una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

III. 2. 1. 4. 1. 3. Luz

Martínez y Águila (1989) aseguraron que la luz juega un papel importante en el enraizamiento de estacas ya que la mayor tasa de fotosíntesis aumenta el aporte de las sustancias orgánicas que se consumen para la formación y el crecimiento de las raíces. También,

suministrada en cantidad suficiente y en buenas condiciones de humedad ambiente, activa la vegetación al favorecer la asimilación clorofílica.

Van der Heede (1981) mencionó que la luz también puede sanear el medio ya que un medio húmedo y oscuro es ideal para el desarrollo de ciertas enfermedades criptogámicas, aunque si la insolación es excesiva puede causar quemaduras, desecación o destrucción demasiado rápida de las auxinas de la planta.

Como se ha comentado anteriormente para un buen enraizamiento es necesario conservar una temperatura del aire que rodea a las estacas baja, sobre todo en especies susceptibles al ennegrecimiento de las hojas por altas temperaturas, por esta razón se aconseja, sobre todo en los meses de verano o en zonas cálidas, la colocación de algún tipo de protección que proporcione un sombreado.

La iluminación artificial puede ser útil para la propagación vegetativa, sobre todo porque aplicada sobre las plantas madres puede adelantar la vegetación de éstas y como consecuencia se hace posible la obtención de estacas sanas y vigorosas en una época adecuada, favoreciendo el posterior enraizado de las mismas (Van der Heede, 1981). Aunque la iluminación artificial puede remediar la falta de insolación, este tipo de luz debe utilizarse con precaución, ya que influye tanto por la cantidad total, intensidad, calidad y periodicidad.

Bertram (1992) sugirió que la aplicación de luz en un rango de irradiación óptima para las plantas madres puede favorecer el enraizamiento, ya que esto supone un incremento en la conservación de auxinas endógenas en la base de los esquejes, las cuales juegan un papel importante a la hora de la iniciación de raíces, ya que las auxinas endógenas promueven la diferenciación celular.

Asimismo, el fotoperiodo puede influir en el enraizamiento. Existen diversas investigaciones que muestran como la calidad de las raíces así como el porcentaje de enraizamiento puede mejorar mediante el incremento de las horas de luz en las camas de propagación.

En la familia Proteaceae tanto las horas de luz como el control de la intensidad, influye en el porcentaje de estacas enraizadas, en el tiempo de formación y en el vigor de las mismas. Una intensidad luminosa en el interior de la instalación de propagación de 5000 foot/candles (bujías/pie) (54.000 lux) es adecuada para el enraizamiento de las estacas de muchas proteas. Sin embargo, esta cifra es insuficiente para las especies y cultivares de *Leucospermum* y *Protea* con

hojas grisáceas y/o pelosas, y para las especies y cultivares de *Leucadendron* con hojas glaucas y pelosas, las cuales requieren más luz, por lo que la intensidad luminosa deberá aumentarse hasta un máximo de 6000 foot/candles (bujías/pie) (68.000 lux). Entre las proteas incluidas en este segundo grupo están *Leucadendron argenteum*, *Leucadendron discolor*, *Leucospermum conocarpodendrum*, *Leucospermum reflexum* y *Protea magnifica* (Harre, 1988).

Malan (1988) obtuvo buenos resultados, en proteas, utilizando un sombreado del 40-50% junto con un sistema de nebulización. Rodríguez Pérez (1993) propuso utilizar un umbráculo con un 40-60% de sombreado, ya que un porcentaje más elevado de reducción de la luz, produciría una reducida fotosíntesis en las estacas (Moffat y Turnbull, 1993).

Faruchi et al. (1997) en un ensayo realizado con *Protea obtusifolia* proporcionó sombreado a las plantas madres en crecimiento vegetativo activo cubriéndolas con una malla de sombreado del 30 y 50%. Las estacas recolectadas de plantas madres sombreadas enraizaron en un porcentaje mayor que las cultivadas a pleno sol. Las estacas recolectadas de plantas sombreadas un 50% mostraron un mayor porcentaje de enraizamiento que las cogidas de plantas sombreadas un 30%, pero en ambos casos el enraizamiento fue mucho más alto que el control (sin sombreado).

Worral (1976) utilizó en su ensayo un invernadero de cristal, con un porcentaje de sombreado del 60%, para estacas de tallo de *Telopea speciosissima*.

III. 2. 1. 4. 1. 4. Aireación

Conforme Moffat y Turnbull (1993), el mantenimiento de humedades relativas elevadas requiere un alto grado de estanqueidad pudiendo causar deficiencias en el intercambio de gases, por lo que será necesario una buena ventilación. El aire debe entrar y salir del invernadero sin formar corrientes de aire fuertes que puedan influir en la formación de la neblina.

Meynhardt (1974), recomienda la protección de las camas de propagación contra el viento, mediante algún tipo de malla metálica o de plástico.

Rodríguez Pérez et al. (2014) al propagar *Leucospermum* ‘Spider’ mediante estacas de tallo, realizaron la práctica en un invernadero de cristal. Dicha instalación estaba dotada de un sistema de “fog” que funcionaba cuando la humedad descendía por debajo de 70% y de un sistema de apertura de la ventana lateral cuando se sobrepasaba en el interior del invernadero 20°C lo cual colaboraba a que la temperatura disminuyera y a proporcionar una cierta aireación.

III. 2. 1. 4. 2. Medio de enraizamiento

Según Martínez y Águila (1989) las estacas deben situarse en un medio de enraizamiento que satisfaga las siguientes condiciones:

- Poseer buen drenaje.
- Presentar condiciones de esterilidad.
- Proporcionar un soporte mecánico a los propágulos.
- Mantener de forma óptima la humedad y la aireación.

Un buen sustrato debe permitir que a tensiones muy bajas de agua (alta humedad del mismo) exista un elevado porcentaje de aire en sus poros, con fácil circulación. Para muchas plantas la velocidad de formación de las raíces y la morfología de las mismas dependerán del tipo de sustrato utilizado.

En ciertas especies, los esquejes enraizados en arena gruesa producen raíces largas, quebradizas y poco ramificadas, mientras que una mezcla, como turba y arena o de perlita y turba, son ramificadas, flexibles y delgadas, es decir, de un tipo más adecuado para su extracción y trasplante a maceta. Estas variaciones se deben a la mayor capacidad de retención de agua y aire de la turba frente a la arena, a igualdad de volúmenes (Martínez y Águila, 1989).

Un sustrato demasiado compacto, bien por la finura de su granulación o bien por excesiva saturación de agua, difícilmente deja penetrar el aire que necesitan los tejidos para realizar su actividad y provocan, con frecuencia, la asfixia de la base de la estaca, ya que el proceso de constitución de raíces tiene un elevado requerimiento de oxígeno. Si es exageradamente poroso, permite circular fácilmente el aire, pero se deseca rápidamente (Van der Heede, 1981).

Los sustratos adecuados son los que quedan adheridos a las raíces formadas una vez terminado el enraizamiento. De esta manera se consigue trasplantar el esqueje con cepellón, quedando garantizado el éxito de esta operación.

En proteas se han utilizado medio compuestos de materiales tales como perlita, turba, fibra de coco, arena, poliestireno (gránulos o perlas, siendo preferibles los primeros) y picón (cenizas volcánicas). La relación de cada elemento en las mezclas varía bastante según las especies a propagar, por ejemplo:

- Jacobs y Steenkamp (1976), propagaron *Leucospermum cordifolium* en un medio formado por una mezcla de poliestireno y turba (1:1-2).

- Criley y Parvin (1979) utilizaron perlita y turba (2:1) en volumen, en la propagación por estaca de *Protea neriifolia*.
- Parvin (1982) empleó una mezcla del 50% de turba gruesa y 50% de perlita en la propagación de estacas de *Leucospermum*.
- Ellyard y Butler (1985), utilizaron para la propagación mediante estacas de hoja y yema, de *Telopea speciosissima* x *T. mongaensis*, un medio de enraizamiento formado por arena, turba y perlita en una proporción de 1:1:1.
- Malan (1988), aconseja una mezcla del 60% de gránulos de poliestireno y 40% de turba, a la cual también se le puede añadir arena de río, creando al final una mezcla con una proporción del 2:1:1 en volumen, aumentando ésta última la aireación del medio.
- Harre (1988) recomienda la utilización en la propagación de *Leucospermum* un medio de enraizamiento compuesto por poliestireno y turba o una mezcla de arena, turba y perlita.
- Ben-Jaacov et al. (1992), para la propagación de *Leucadendron* ‘Orot’ utilizó un medio compuesto por 75% de cortezas y 25% de turba.
- Faruchi et al. (1997) en la propagación por estacas de tallo de *Protea obtusifolia* utilizaron una mezcla de fibra de coco y poliestireno (1:1) (v/v).
- Krisantini et al. (2003) en la propagación por estacas de tallo de dos cultivares de *Grevillea* utilizó una mezcla de turba, perlita y vermiculita (1:1:1).
- Blomerus y Malan (2014) utilizaron una mezcla de turba, arena y poliestireno (1:1:1 v/v) en la propagación de *Protea* ‘Lady Di’, *Protea* ‘Niobe’, *Protea* ‘Pinita’, *Protea* ‘Pink Ice’ y *Protea* ‘Susara’.
- Oliveira et al. (2012) utilizó una mezcla de turba, arena poliestireno triturado (2:2:1) al propagar estacas de tallo de varias especies y cultivares de los géneros *Leucadendron*, *Leucospermum* y *Protea*.
- El poliestireno se puede usar mezclado con turba en proporciones que van de 1:1 a 3:1 en volumen. En la Unidad del Fynbos emplean una mezcla formada por arena gruesa, turba o fibra de coco y gránulos de poliestireno (1:1:2 en volumen). La perlita se suele mezclar

con turba a razón de 1:1 en volumen. El picón mezclado con la turba, a partes iguales, también puede emplearse. También se está utilizando sólo fibra de coco que ha tenido mucho éxito con algunas proteas y en ciertas condiciones ambientales (Meynhardt, 1974; Jacobs y Steenkamp, 1975; Malan, 1992; Jeffhas y Van der Berg, 1995; Rodríguez Pérez, 1993 y 1998).

- Vera Batista (2016) utilizó un sustrato formado por un 60% de gránulos de poliestireno y un 40% de turba, en la propagación por estacas de *Protea* 'Pink Ice' y *P.* 'Susara'.

III. 2. 1. 4. 3. Tratamientos químicos que mejoran el enraizamiento

III. 2. 1. 4. 3. 1. Hormonas vegetales

Actualmente se conoce que la actividad fisiológica de las plantas se regula por una serie de sustancias de origen químico conocidas como hormonas. En la segunda mitad del siglo XIX, Julius von Sachs sugirió, por primera vez, la presencia de hormonas reguladores de crecimiento en las plantas, sustancias que debían ser responsables de la formación de órganos, y que debían ser producidas en las hojas y transportadas hacia abajo al resto de la planta.

Tukey et al. (1954) establecieron que las hormonas vegetales eran reguladores producidos por plantas, que en bajas concentraciones, regulan los procesos fisiológicos de las mismas.

Como característica de las fitohormonas se puede declarar que será imprescindible que las hormonas se desplacen dentro de la planta desde un centro de producción a su lugar de acción. Las fitohormonas participan en el crecimiento, diferenciación y desarrollo así como otros procesos como, movimientos de los estomas (Davies, 1995).

Edwards (1979) manifestó que hay cinco tipos de reguladores de crecimiento: auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y grupos micelánicos, en los cuales se incluyen abscísicos y otros inhibidores. Hay sustancias como la Tiamina y Niacina, y algunas vitaminas que probablemente podrían actuar como hormonas reguladoras de crecimiento, aunque su actividad como co-factores enzimáticos si es diferente de las hormonas. Últimamente se han descubierto sustancias que podrían incluirse en la lista de fitohormonas como son: sistemas peptídicos, poliaminas, jasmonatos (derivados de ácido tuberónico), ácido salicílico y brasinoesteroides (Davies, 1995).

Auxinas

Kögl et al., (1934) aislaron por primera vez una auxina, conocida como ácido indol-3-acético (IAA).

Están en la planta de forma libre e inactiva, y de forma combinada y activa, entre las que se instaura un equilibrio dinámico. La iniciación y regulación del crecimiento se logra controlar gracias a varios equilibrios establecidos entre la auxina libre y la auxina combinada en varios centros de crecimiento de la planta. Es posible que la auxina sea transportada en forma libre desde el lugar de formación a su zona de actividad (Devlin, 1980).

El IAA puede manifestarse como distintos conjugados semejantes al aspartato indolacético. Este IAA se sintetiza a partir de tritófano o indol, fundamentalmente en los primordios de las hojas, hojas jóvenes y semillas. Luego es transportado célula a célula, y el transporte hacia las raíces quizás sea envuelto en el floema (Davies, 1995).

Según Davies (1995) la influencia del IAA sobre distintos procesos es:

- Alargamiento celular: las auxinas estimulan el alargamiento y el crecimiento del tallo.
- División celular: estimulan la división celular en el cambium y, en combinación con citoquininas lo hacen en cultivo de tejidos.
- Diferenciación del tejido vascular: estimulan la diferenciación del xilema y floema.
- Iniciación de raíces: estimulan la iniciación de raíces en estacas de tallo, y también la diferenciación de las raíces en cultivos de tejidos.
- Tropismos: intervienen en los trópicos de yemas y raíces respecto a la luz y a la gravedad.
- Dominancia apical: abastecen a la yema apical reprimiéndose el crecimiento de las yemas laterales.
- Senescencia de las hojas: retrasan las senescencias de las hojas.
- Abscisión de las hojas y frutos: pueden inhibir o promover la abscisión (vía etileno) de las hojas y frutos dependiendo del tiempo y posición de los suministros.
- Crecimiento de frutos: producen este efecto en algunos frutos.
- Maduración de frutos: retraso de la maduración de frutos.
- Floración.

Posterior al descubrimiento del ácido indol-3-acético comenzó la búsqueda de otras auxinas naturales, pero esta fue un fracaso (Blazich, 1988). Actualmente, el ácido indol-3-acético es considerado la auxina de producción natural más importante encontrada en las plantas (Moore,

1979, citado por Blazich, 1988). Por otro lado, se han encontrado sustancias conocidas como auxinas sintéticas que incluyen el ácido indolbutírico (IBA) y el ácido naftalenacético (NAA), así como otros compuestos fenólicos como: ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido triclorofenoxiacético (2,4,4-T).

El efecto de los reguladores de crecimiento sintéticos es diferente al que se produce utilizando la auxina natural. La aplicación de la auxina natural IAA produce buenos resultados, sin embargo requiere de dosis más altas, puesto que se inactiva con mayor facilidad, por lo que se hace imprescindible que las dosis sean mayores (Martínez y Águila, 1989).

La auxina más utilizada es el IBA debido a que se descompone con relativa lentitud por acción de los sistemas enzimáticos vegetales que destruyen auxinas. Además, este producto se mueve poco en la planta, reteniéndose en el lugar de aplicación. El NAA es también muy usado, aunque es más tóxico que el IBA, para las plantas (Martínez y Águila, 1989).

Las auxinas son la clase de fitohormonas que están implicadas en muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Davies, 1995). El IAA fue la primera hormona de planta utilizada para estimular el enraizamiento de estacas (Cooper, 1935). Sin embargo, se descubrió una nueva auxina sintética, el IBA que también promovía el enraizamiento, siendo esta más efectiva que el IAA (Zimmerman y Wilcoxon, 1935). El IBA es ampliamente utilizado en el mundo para enraizar muchas especies de plantas. Hace más de 50 años, desde su introducción, el IBA, ha estado sujeto a diversos experimentos en los que se estudian diferentes concentraciones, formulaciones, aditivos y duración del tratamiento para conseguir un óptimo enraizamiento de las especies en cuestión, aunque hay especies y cultivares que no responden al enraizamiento usando distintos tratamientos con IBA (Ludwing-Müller, 2000).

En numerosos ensayos se han utilizado IBA, IAA y NAA, en diferentes dosis, preparaciones, etc., para la propagación de especies y/o cultivares de la familia Proteaceae.

Parvín et al. (1973) estudiaron la propagación de estacas de tallo de *Leucospermum cordifolium* empleando tres hormonas de enraizamiento diferentes: IBA, IAA y NAA de manera independiente o combinados. Las concentraciones empleadas fueron 0.1, 0.2 y 0.4% en talco. Los resultados más significativos se lograron con IBA y IAA al 0.2%, siendo la combinación más efectiva IAA/IBA con la que se obtuvo el porcentaje mayor de enraizamiento.

Para propagar estacas de *Leucospermum cordifolium* e híbridos, Jacobs y Steenkamp (1976) emplearon polvo o una solución concentrada de IBA a una dosis de 4000 ppm, obteniendo

buenos resultados con ambos tipos de preparaciones. También comprobaron en dicho ensayo que cuando las plantas madres están en desarrollo vegetativo, las estacas responden mejor a bajos niveles de IBA que cuando están en reposo invernal.

Worrall (1976) ensayó cinco concentraciones de IBA en estacas de *Telopea speciosissima*. Las concentraciones estudiadas fueron: 500, 1000, 2000 y 4000 ppm de IBA. Los mejores resultados, es decir, mayor porcentaje de enraizamiento se obtuvo con 4000 ppm de IBA, pero también usando dicha concentración se contabilizó un alto porcentaje de estacas muertas, posiblemente debido a que esa concentración resultaba toxica. Con la concentración de 2000 ppm de IBA se obtuvo un resultado óptimo de enraizamiento, sin presentarse toxicidad.

Criley y Parvin (1979) ensayaron el efecto que producía la utilización de auxinas (IAA e IBA), solas o combinadas con ethefon y darninozida, en estacas de *Protea neriifolia*. Se logró un enraizamiento más rápido y un mayor valor del índice de enraizamiento cuando las estacas se sometieron al tratamiento combinado de ethefon (300 ppm) y IAA (4000 ppm), seguido de una preparación comercial para enraizar compuesta de 1% de IBA + 0.5% NAA diluido 1:9. El tratamiento con auxinas solo no dio buenos resultados, incluso utilizando concentraciones altas, 7000 ppm, tanto de IBA como de IAA.

Vogts (1982) obtuvo buenos resultados al tratar las estacas de *Leucadendron* y *Leucospermum* con concentraciones de IBA que oscilaron entre los 4000 y 8000 ppm de IBA, sumergiendo en la preparación hormonal durante 5 y 10 segundos, la parte basal de las estacas.

Jacobs (1983) confirmó que aumentó el enraizamiento de estacas de proteas sumergiendo sus bases en una solución de IBA a una concentración que varió entre 4000-8000 ppm de IBA disuelto en alcohol etílico al 50% y un tiempo de inmersión de 5 y 10 segundos.

Brits (1986) realizó un ensayo en el que combinó varios factores que influían en el enraizamiento de las estacas de varias especies del género *Leucospermum*. Empleó estacas terminales y subterminales, con o sin calor de fondo, cuatro formulaciones de IBA aplicadas humedeciendo la parte basal en una solución de 5 gr/l de concentración o en una preparación en polvo de 10 gr/kg. Los mejores resultados los obtuvo utilizando estacas terminales con altas temperaturas, sin embargo no con las bajas. La preparación en polvo de 10 gr/kg de IBA con las bajas temperaturas dio el mejor porcentaje de enraizamiento.

Para la propagación de estacas de *Leucospermum* se recomienda utilizar hormonas de enraizamiento en unas concentraciones entre 1500 y 2000 ppm (Harre, 1988).

En general, Malan (1992) recomienda para la propagación de proteas, introducir 2 mm de la parte basal de las estacas en un solución de 5 gr/l de IBA diluido en etanol al 50% durante 3 segundos. Aparte de esto, da una serie de pautas a seguir en la propagación por estacas de tallo:

- a) Concentración de la auxina: las concentraciones óptimas para cada variedad considerablemente (Rosseau, 1966; Jacobs y Steenkamp, 1976; Harre, 1988). Los requerimientos individuales deberían evaluarse.
- b) Modo de aplicación de la auxina: aparentemente el mejor método de aplicación es en talco a bajas temperaturas; diluida en etanol al 50% cuando la temperatura es alta (Rosseau, 1966; Brits, 1986; Gouws et al., 1990).
- c) Tratamientos adicionales: el empleo de mezclas de ciertos reguladores de crecimiento (conocidos como cocktails) como son el ácido giberélico, ethrel y daminozida en combinación con IBA dará lugar a resultados variados (Criley y Parvin, 1979; Brits, 1986; Gouws et al., 1990); lesionado en la base de las estacas (Rodríguez Pérez, 1990) y otros pre- tratamientos (Harre, 1989).

Ackerman (1993) en su experimento realizado con variedades de *Leucadendron discolor* concluyó que altas concentraciones de IBA facilita el proceso de enraizamiento en proteas, aplicándose en la base de las estacas. Además, algunas variedades de la misma especie, difíciles de enraizar, pueden presentar requerimientos diferentes en cuanto a concentración y tipo de hormona.

Faruchi et al. (1997), en su estudio concluyeron que para la propagación con estacas de tallo de *Protea obtusifolia*, recomiendan la utilización de IBA en forma líquida a una concentración de 2000 ppm, pudiendo también utilizarse IBA en polvo en una concentración de 0.4%.

Krisantini et al. (2006), realizaron un ensayo con dos cultivares de *Grevillea*, *G.* 'Coastal Dawn' y *G.* 'Royal Mantle', y sometieron a las estacas de ambos cultivares a tratamientos con IBA y IAA a diferentes concentración (4, 8, 16 gr/l) comprobando que hubo diferencias significativas entre IAA e IBA en su efecto en el enraizamiento. IAA a los rangos de concentraciones testadas lograron menos de un 50% de estacas enraizadas en *G.* 'Royal Mantle', mientras IBA a la concentración más baja fue más efectiva que en las concentraciones más altas, dando más de un 70% de estacas enraizadas.

En otro ensayo, Krisantini et al. (2011) sometieron a las estacas de dos cultivares de *Grevillea*, *G.* 'Coastal Dawn' y *G.* 'Poorinda Royal Mantle' a diferentes tratamientos de IBA que

diferían en el método de aplicación. Los tratamientos fueron IBA 1gr/l en aplicación basal, IBA 1 gr/l en aplicación superficial e IBA en polvo 16 gr/kg. La aplicación superficial o por la parte superior obtuvo un porcentaje de enraizamiento mayor que la aplicación basal a la misma concentración, particularmente en *G. 'Poorinda Royal Mantle'*, obteniéndose el mismo porcentaje con la preparación en polvo.

Rodríguez Pérez et al. (2011) experimentaron el efecto de diferentes concentraciones de IBA y lesionado sobre el enraizamiento de estacas de *Protea 'Susara'* preparadas a partir de brotes prolépticos. Para ello se emplearon diferentes concentraciones de IBA (2000 y 4000 mg/l) y lesionado o no de las estacas que incluían toda la longitud del brote. Al final del ensayo, las estacas lesionadas y tratadas con 2000 o 4000 mg/l IBA produjeron un 90% de estacas trasplantables.

Rodríguez Pérez et al. (2014) estudiaron para el enraizamiento de *Leucospermum 'Spider'*, el efecto de la posición de la estaca, lesionado e IBA. Se emplearon estacas terminales y subterminales, lesionado y los tratamientos con diferentes concentraciones de IBA (2000 y 4000 ppm). Las estacas subterminales lesionadas tratadas con 4000 ppm lograron los mejores porcentajes de estacas trasplantadas.

Vera Batista (2016) estudió el enraizamiento en estacas de *Protea 'Pink Ice'* y *P. 'Susara'*, el efecto de diferentes concentraciones de IBA (4000,8000 ppm), putrescina y la combinación de ambos. Al final del ensayo, las estacas de *P. 'Pink Ice'* tratadas con 8000 ppm mejoraron el porcentaje de estacas trasplantables, pero no de manera significativa. Sin embargo, para el cultivar *P. 'Susara'* se lograron mejores porcentajes de estacas trasplantables cuando se empleó la combinación de putrescina + IBA.

Giberelinas

Las giberelinas deben ser consideradas como fitohormonas de crecimiento natural, debido a la gran distribución en las plantas y a las distintas respuestas específicas a la aplicación externa de la misma, en cada tipo de planta. En 1938, Yabuda et al. (citado por Devlin, 1980), lograron aislar la giberelina en forma cristalina, es decir, el ácido giberélico (GA_3).

Desde hace tiempo se ha investigado el efecto del ácido giberélico en la estimulación en la formación de raíces adventicias. Además se comprobó que este ácido modificaba las formas enanas de las plantas y que su actividad no se limitaba a la elongación de gramíneas. También, puede promover la floración de plantas de día largo en condiciones de día corto, inducir la partenocarpia, etc.

Curtis et al. (1954) (citado por Hansen, 1988) compararon en un experimento los efectos del ácido giberélico con los de las auxinas. Al final del ensayo, llegaron a la conclusión que el ácido giberélico, en muchos procesos fisiológicos, tuvo efectos opuestos a los obtenidos con las auxinas de manera que la formación de raíces adventicias que era estimulada por las auxinas, era inhibida por el ácido. Las auxinas generalmente contrarrestan la inhibición de la formación de raíces por giberelinas, y que la estimulación del enraizamiento por el ácido giberélico, aunque se ha visto en pocas especies, puede aumentarse por la aplicación simultánea de auxinas (Hansen, 1988).

Las giberelinas son transportadas por el floema, de manera libre o combinada, inactivándose por mecanismos como la unión a otras moléculas. Se sintetizan a partir de un hidrocarburo conocido por ENT-KAURENO. Además, producen un alargamiento de entrenudos y extensión de zonas subapicales, intervienen en la expansión de las hojas, actúan en fenómenos de partenocarpia y germinación de algunas semillas, etc.

Citoquininas

Las citoquininas engloban una serie de sustancias que poseen actividad estimulantes sobre la división celular. Son sustancias derivadas de la purina denominada adenina, que se conoce por ser una de las bases nitrogenada de las moléculas de los ácidos nucleicos DNA y RNA. Entre ellas se encuentra la kinetina, éste compuesto fue aislado a partir del DNA de la levadura, por Miller et al. (1955).

Las citoquininas están relacionadas con el agrandamiento celular, efecto que se asocia a IAA y a las giberelinas, retrasando la senescencia así como la finalización del reposo, promoviendo la germinación de semillas en condiciones de oscuridad, teniendo un efecto estimulador en el crecimiento de yemas ya iniciadas, e inician e inducen el crecimiento tanto de la parte aérea como la parte radicular (Devlin, 1980); (Gómez Campo, 1979).

La promoción de la formación de raíces adventicias en estacas mediante la aplicación de citoquinina exógena es escaso, ya que ninguna de las formulaciones comerciales disponibles para la inducción radicular contiene citoquininas (Van Staden et al., 1988).

Las citoquininas en las plantas producen importantes efectos, como: división celular, morfogénesis, crecimiento de yemas laterales, expansión de la superficie foliar, además de retrasar la senescencia y desarrollo de cloroplastos.

Ácido abscísico

Es una sustancia hormonal que actúa como retardador natural del desarrollo. En la universidad de California (Davis), en la década de los sesenta, se pudo aislar e identificar el ácido abscísico (ABA) (Ohkuma et al., 1965).

Actividad biológica de amplio espectro, como es la dormición de yemas y semillas, acelera la senescencia de órganos, regula la actividad estomática e inhibe el desarrollo donde se ha aplicado ABA exógenamente, aunque para ello es necesario una exposición continuada, no siendo suficiente un solo tratamiento (Gómez Campo, 1979). Es sintetizado a partir del ácido menalánico, en órganos envejecidos. Está implicado directamente en la caída de las hojas es exportado desde las raíces por el xilema y desde las hojas por el floema. Sin embargo, no implica que pueda circular por las raíces por el floema y retorne a las yemas por el xilema.

En diversos estudios acerca del efecto que produce la aplicación de ABA en la aparición de raíces adventicias, se han obtenido distintos resultados:

- Fomentar el enraizamiento (Chin et al., 1969; Blazich et al., 1977; Rasmussen et al., 1980; citados por Davis, 1988).
- Inhibir el enraizamiento (Heide, 1968; Krishnamoorthy, 1972; Venverloo, 1976; citados por Davis, 1988).
- No tenían efecto (Krelle et al., 1969; Biran et al., 1973; citados por Davis, 1988).

En relación con otras hormonas, se ha demostrado que el ABA tiene efectos opuestos al GA_3 que induce la formación de raíces adventicias (Chin et al., 1969; Coleman et al., 1976; Hartung et al., 1980; citados por Davis, 1988). Sin embargo, cuando se aplica junto con auxinas, tratamientos con ABA fomenta el enraizamiento, tendiendo efectos aditivos (Basu et al., 1970; citados por Davis, 1988).

III. 2. 1. 4. 3. 2. Otros reguladores de crecimiento

Además de las principales hormonas existen otros compuestos naturales que influyen sobre el crecimiento de las plantas en bajas concentraciones, estas se agrupan en diversos grupos:

- Grupo A. Compuestos producidos por plantas inferiores que regulan su desarrollo como son: el ácido trispórico (hongos) y el ácido lunulárico (algas, similares al ABA en las plantas superiores).

- Grupo B. Compuestos producido por microorganismo que estimulan el crecimiento de plantas superiores, como son: helmintosporol (extraído de hongos, de acción similar a las giberelinas), fusicoccina (de hongos) y malformina (de *Aspergillus niger*).
- Grupo C. Compuestos presentes en plantas superiores, pero que afectan a su crecimiento cuando se aplican de forma exógena, como son: ácidos fenólicos, flavonoides y cumarinas (inhiben la acción de las auxinas).
- Grupo D, las vitaminas. Compuestos orgánicos que, en bajas concentraciones, desempeñan funciones catalíticas y reguladoras del metabolismo vegetal y, por tanto, de su crecimiento y desarrollo.

Por otro lado, existen otras moléculas como las poliaminas, de naturaleza policatiónica; y compuestos químicos, como el peróxido de hidrogeno, que pueden influir sobre el crecimiento de las plantas.

Poliaminas

Son poli cationes nitrogenados, alifáticos, de bajo peso molecular. Se presentan en organismos vivos en forma libre o conjugada. Las poliaminas más comunes son espermidine (una triamina), espermine (una tetramina) y putrescina (una díamina) (Galston y Kaur-Sawhney, 1995). Numerosos estudios muestran que este versátil poli catión juega un papel vital como molecular en muchos procesos biológicos (Bagni et al. 1992). Estos procesos incluyen germinación de semillas y dormancia, estabilización de las membranas y ácidos nucleicos, control de la estructura proteica y actividad enzimática. Además, se han relacionado con la división celular, diferenciación vascular, formación del embrión somático en cultivo de tejidos, iniciación radicular, formación de los brotes adventicios, iniciación y desarrollo de la floración, control de la madurez y senescencia de la fruta (Galston y Kaur-Sawhney, 1995).

Pueden aumentar el enraizamiento en estacas de tallo cuando se aplican con auxinas, sin embargo, las poliaminas solo parecen tener un limitado efecto en la formación de raíces adventicias, al menos no es considerado esencial.

Peróxido de hidrógeno

Durante varios años, el peróxido de hidrógeno fue considerado como un metabolito celular toxico. Sin embargo, actualmente, está claro que funciona como una señal molecular que media en la respuesta a determinados estímulos en las células de plantas y animales (Neil et al., 2002). Peróxido de hidrógeno se genera continuamente por varias fuentes durante el metabolismo normal de las células vegetales. El proceso de transporte de electrón durante la fotosíntesis y

respiración genera niveles basales de peróxido de hidrógeno. Esto también ocurre en las células de las plantas en respuesta a una amplia variedad de estrés, tanto abiótico como biótico.

El peróxido de hidrógeno media varios procesos fisiológicos y bioquímicos, incluyendo sistema de resistencia adquirida y resistencia hipersensitiva (Álvarez et al., 1998; Melillo et al., 2006), senescencia (Hung et al., 2006), cierre de estomas, gravitropismo radicular, desarrollo de raíces laterales (Su et al., 2006), desarrollo de la pared celular (Potikha et al., 1999). No obstante, no se conoce con certeza si el peróxido de hidrógeno es un mensajero en ácido-3-indolacético (IAA) inducido en la formación de raíces adventicias o un mediador de los eventos que son responsables del enraizamiento adventicio. También incrementa la actividad de enzimas tales como superóxido-dismutasa y catalasa y está también ligado a la morfogénesis.

Rugini et al., (1997) experimentaron el efecto del peróxido de hidrógeno y las poliaminas en la formación de raíces en olivo, tanto en vivo como *in vitro*. Para el ensayo *in vivo* se escogió el cultivar *Olea* 'Frangivento' cuyas estacas fueron sometidas a los siguientes tratamientos: solución que contiene 2000 ppm de IBA en alcohol/agua (1:1 w/v) seguido de peróxido de hidrogeno a 3.5% volumen o en 1mN solución acuosa de putrescina HCl a los 0, 2 y 5 días. Los tratamientos suministrados el quinto día no afectaron el enraizamiento, mientras que ambos promovieron un rápido enraizamiento e incrementaron el porcentaje final cuando fueron aplicados en la preparación de las estacas. También afectó el enraizamiento el segundo día de aplicación del peróxido de hidrógeno.

En un ensayo con dos cultivares de olivo, *Olea* 'Frantoio' y *O.* 'Gentile di Larino', Sebastiani y Tognetti (2004) estudiaron el efecto del grado de desarrollo y de la aplicación de peróxido de hidrogeno sobre la inducción y desarrollo radicular en las estacas. Los tratamientos que se aplicaron fueron: 4000 ppm IBA y peróxido de hidrógeno (0% el control o 3.5% w/v). En ambos cultivares y años, 4000 ppm de IBA + peróxido de hidrógeno modifico significativamente el enraizamiento de las estacas en comparación con las estacas tratadas con 4000 ppm de IBA solo.

Li et al. (2009a) expresaron que aplicaciones exógenas de peróxido de hidrogeno promovían la formación y desarrollo de raíces adventicias en plantas *Vigna radiata* y manifestaron que puede funcionar como una señal molecular en la inducción auxínica en formación de raíces adventicias en plantas de semillero. Los tratamientos durante 8-18 horas, con 1-100 mM de peróxido de hidrógeno indujeron significativamente la formación y desarrollo de raíces adventicias.

Liao et al. (2010) observaron el efecto del óxido nítrico y del peróxido de hidrógeno en el desarrollo de raíces adventicias de los esquejes de *Dendrathera morifolium* 'Beiguozhicun'. El uso de peróxido de hidrógeno tuvo un efecto positivo en el enraizamiento, dependiendo de la dosis. Aumentó el porcentaje de enraizamiento, número de raíces por esqueje y longitud de las raíces a bajas concentraciones (50-200µM), mientras que a altas concentraciones (500, 1000 µM) esas características decrecieron.

Aslmoshtaghi y Shahsavari (2011) estudiaron el efecto del IBA y del peróxido de hidrógeno en el enraizamiento de dos cultivares de olivo, *O.* 'Roghani' y *O.* 'Tokhmkabki'. Las estacas se sometieron a diferentes tratamientos con peróxido de hidrógeno (0-3.5% W/V) e IBA (4000 mg/l) y la combinación de ambas sustancias. El uso de peróxido de hidrógeno solo no estimuló el enraizamiento de las estacas y no se apreciaron diferencias significativas entre este tratamiento y el control en ambos cultivares. IBA incrementó el porcentaje de enraizamiento, número de raíces por estaca, longitud y peso de las raíces en ambos cultivares, pero la combinación de IBA y peróxido de hidrógeno, aunque fue más efectiva en determinados factores estudiados, no exhibió diferencias significativas con IBA solo.

Tehraniyar et al. (2014) emplearon estacas de *Berberis thunbergii* var. *atropurpurea* y *Berberis vulgaris* var. *asperma*, para comprobar la influencia del tratamiento combinado de la auxina con peróxido de hidrógeno. Para ello trataron las estacas con IBA solución (3gr/l) + peróxido de hidrógeno al 3,5%. Las raíces surgieron en *Berberis thunbergii* var. *atropurpurea*, pero no en *Berberis vulgaris* var. *asperma*. En las estacas *Berberis thunbergii* var. *atropurpurea* tratadas con IBA + peróxido de hidrógeno lograron porcentajes de enraizamiento más altos, mayor número y longitud de raíces que las no tratadas.

Vera Batista (2016) estudio el efecto del IBA, putrescina, peróxido de hidrógeno y combinación de los mismos, sobre el enraizamiento de las estacas de *Protea* 'Susara' y *P.* 'Pink Ice'. Al final del ensayo, para el enraizamiento de *P.* 'Susara', se obtuvieron mejores resultados con 8000 ppm de IBA no mostrando diferencias significativas cuando se aplicó talco (control). Sin embargo, en el enraizamiento de *P.* 'Pink Ice', los mejores resultados se lograron cuando se aplicó peróxido de hidrógeno solo, aunque no mostró diferencias significativas con la aplicación de 8000 ppm de IBA, putrescina y putrescina + 4000 ppm de IBA.

Etileno

Actualmente se conoce que el gas etileno es un componente activo que causante de la maduración de frutos y senescencia de los tejidos.

Según Gómez Campo (1979) la producción de etileno es mayor, cuando los tejidos vegetales se encuentran dañados o sometidos a situación anormal de cualquier tipo. En los años treinta se observó que este gas no era una sustancia ajena al metabolismo vegetal, sino que en condiciones normales, todos los tejidos vegetales lo producen endógenamente en cantidades bajas pero apreciables.

A temperatura fisiológica se encuentra en estado gaseoso, por lo que se podrá difundir de la célula que lo sintetiza a células contiguas. Además, es sintetizado a partir de la metionina, y es el único hidrocarburo que tiene efectos sobre las plantas.

El ácido 1-aminocicloporpano-1-carboxílico (ACC) es una sustancia precursora que puede ser transportada a distancias desde el lugar del estímulo y actuar como el etileno (Davies, 1995).

El etileno, inhibe la elongación celular de la raíz y de las yemas, provocando un incremento en el crecimiento lateral. Pero puede dar lugar a un clara inhibición o estimulación del desarrollo (Edwards, 1979). El “Ethrel” es un producto químico usado para acelerar la maduración de la fruta y que aumentaba el número de raíces de las estacas pero disminuía su longitud (Krishnamoorthy, 1970; citado por Edwards, 1979).

Diversos autores han comentado, respecto a la interacción auxina-etileno, que la estimulación de la auxina al enraizamiento, podría ser debida a que la auxina estimulaba la producción de etileno (Zimmerman et al., 1935; Abeles 1973; Linkins et al., 1973; Robbins et al, 1983; citado por Mudge, 1988). Por otro lado, hay varios estudios donde la estimulación del enraizamiento con auxinas no fue afectada por la presencia de etileno (Linkins et al., 1973; Mudge, 1988), o actuó como antagonista (Coleman et al., 1980; Geneve et al., 1983; citados por Mudge, 1988).

Para Davies (1995), el etileno puede producir los siguientes efectos sobre las plantas:

- Apertura floral
- Retrasa la dormancia.
- Abscisión de hojas y frutos.
- Senescencia de flores y frutos.
- Diferenciación de yemas y raíces.
- Inducción floral en algunos frutos.

III. 2. 1. 4. 4. Control sanitario

Un aspecto fundamental en la propagación vegetativa de plantas es un adecuado control sanitario, que proporcione el mantenimiento de las estacas sanas y vigorosas durante el tiempo que permanecen en las instalaciones de propagación. Este control debe empezar por las plantas madres, puesto que es aconsejable que el material de propagación proceda de plantas en buen estado sanitario, es decir, que estén libres de plagas y enfermedades; además, es conveniente recoger el material para estacas de la parte superior, ya que cerca del suelo es más probable que pueda estar contaminado con organismos patógenos del mismo. (Hartman y Kester, 1989). Por esta razón se deben establecer rigurosos programas de control que consisten en tratamientos periódicos contra plagas y enfermedades, así como realizar un adecuado programa de podas (Rumbal, 1977).

Habrá que mantener libre de cualquier tipo de patógeno el invernadero, camas de enraizamiento, mesas de trabajo, etc., en general, el espacio que se va a emplear para la propagación (Rumbal, 1977). Por ejemplo, a la hora de preparar las estacas se debe desinfectar todo el equipo y utensilios con una solución de formaldehído (Vogts, 1982).

Una vez adquiridas las estacas, éstas deben sumergirse en una solución fungicida. Si se emplea como hormona de enraizamiento el ácido indolbutírico (IBA), y se utiliza en tratamientos de inmersión concentrada, se deja secar la base de la estaca y se pasan éstas por fungicida en polvo, ya sea Captan al 25% o Carbendazima al 50%, antes de colocarlas en el medio de enraizamiento (Hartman et al., 1990).

Las condiciones de temperatura y humedad, en el lugar de enraizamiento, favorecen el desarrollo de enfermedades fúngicas. Durante el periodo de tiempo que permanecen las estacas en el medio es aconsejable seguir un programa de tratamientos semanales, alternando fungicidas tales como Mancoceb, Tiram o Captan, a los que puede asociarse, Clortalonil o Iprodione (Jacobs y Steenkamp, 1975).

En el caso de que se observaran estacas muertas o con síntomas de enfermedad, éstas deben retirarse lo más pronto posible para evitar que la enfermedad se siga propagando (Martínez y Águila, 1989).

III. 2. 1. 4. 4. 1. Plagas, malas hierbas y enfermedades en el cultivo de proteas

Plagas y malas hierbas

Principalmente las plagas que atacan a las proteas fuera de sus hábitats naturales con polífagas, es decir, que atacan a otros cultivos. Entre ellas destacan *Aphis gossypii*, *Hyperomyza lactucae*, *Pantomorus cervinus*, *Coccus hesperidum*, *Proctoelaps vandenbergi*, *Aceria proteae*, *Meloidogyne incognita*, entre otras.

Por otro lado, las malas hierbas también afectan a los cultivos de proteas, por lo que para el control de las mismas se utiliza la escarda manual, la escarda química y los acolchados.

Enfermedades fúngicas

Entre las enfermedades que afectan a las proteas están las producidas por los hongos: *Phytophthora cinnamoni*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Drechslera dematioidea*, *Furarium sp* y *Rhizoctonia solani*.

- *Phytophthora cinnamoni*

En la propagación vegetativa se manifiesta como un decaimiento de las estacas y la podredumbre de las nuevas raíces. En estacas con lesiones, la parte basal del tallo se vuelve necrótica, extendiéndose dicha necrosis desde la superficie cortada hasta el interior del tallo y, frecuentemente, la parte superior a la zona lesionada muestra una coloración marrón oscuro (Benic, 1986).

Para el control y prevención de esta enfermedad se adoptan una serie de medidas, como:

- El vivero debe establecer en un emplazamiento bien drenado.
- La circulación dentro del vivero debe ser controlada.
- Evitar la penetración de aguas de escorrentía dentro del vivero.
- Impedir el contacto entre los contenedores (bolsas de plástico, macetas, etc.) y el suelo.
- Esterilización de los medios de plantación.
- Desinfección de aperos y calzado.
- No introducir contenedores procedentes de otros viveros.
- Eliminación de plantas muertas y malas hierbas (Brits y Von Broembsen, 1978; Benic, 1986).

- Utilización de productos químicos, tales como Metalaxil 8% + Mancozeb 64% o Fosetil-Al 80% (Greenhalgh, 1983).
- Utilización de plantas tolerantes y de patrones tolerantes como *Leucospermum* ‘Spider’.

- *Botrytis cinerea*

En proteas se manifiesta con zonas necróticas en las estacas, sobre todo en aquellas en las que se ha practicado algún tipo de lesionado. Además, la inoculación del patógeno se ve favorecida por condiciones de elevada humedad ambiental y medios de enraizamiento encharcados. Principalmente ataca a inflorescencias y brotes jóvenes, marchitando las flores y necrosando los tejidos circundantes al punto de infección (Benic, 1986).

Para controlar esta enfermedad puede realizarse pulverizaciones con benomilo o iprodione (Greenhalgh, 1983). Además, pueden emplearse fungicidas como vinclozolina y, cuando el ataque es muy intenso, el uso de fungicida sistémicos, como benomilo en combinación con captan proporciona un control efectivo y previene la aparición de resistencias (Soteros, 1988).

- *Colletotrichum gloeosporioides*

Este hongo se ha manifestado en estacas de Proteaceae, tales como *Protea repens*. Los síntomas son necrosis en las hojas, seguida en muchos casos de defoliación, desarrollo de chancros en el ápice de las estacas, lesión que se extiende posteriormente hacia el interior del tallo, produciendo, en estudios anteriores, pérdidas de hasta un 70% de estacas de *Protea repens* y en híbridos de *P. compacta x P. neriifolia* (Benic, 1986).

Para el control de este hongo en la propagación vegetativa, las estacas, después de preparadas, deben sumergirse en una solución de difolatán o benomilo, y una vez plantadas, deben efectuarse tratamientos con los fungicidas mencionados (Benic, 1986).

- *Drechslera dematioidea*

Este patógeno es el responsable de la enfermedad conocida como “fuego de los acericos” que afecta a plantas cultivadas y estacas del género *Leucospermum*. La sintomatología principal es la aparición de lesiones de forma irregular en las hojas, estas lesiones cuando se inicia la infección son de color marrón claro, volviéndose posteriormente, marrón grisáceo más oscuro. Además, se manifiesta mediante el desarrollo de chancros de color rojo vivo en la corteza de las ramas (Knox-Davies et al., 1986).

Von Broembsen (1986) recomienda el uso de iprodione, mediante pulverizaciones frecuentes para el control de esta enfermedad. También puede ser controlada con tratamientos a base de ronolan, que inhibe el crecimiento del patógeno (Maughan, 1983); así como el empleo de propiconazol o procloraz (Soteris, 1987).

- *Furarium sp* y *Rhizoctonia solani*

Estas enfermedades son responsables, en muchos casos, del llamado “Damping off” (podredumbre de los semilleros) y del decaimiento general de las plántulas en varias especies de pertenecientes a la familia Proteaceae. Además ocasionan daños en la base de las estacas. *Rhizoctonia solani* ha sido detectada en estacas de *Protea repens*, manifestando necrosis en la base de las estacas (Knox-Davies et al., 1986).

Para controlar los ataques durante la propagación vegetativa, Knox-Davies et al. (1986) recomiendan empapar las estacas en una solución de captafol en agua, en concentraciones de 0,05% a 0,15% (p/v), para seguidamente proceder a la plantación.

- *Alternaria*, *Cladosporium*, *Leptosphaeria*, *Mycosphaerella* y *Stigmina*

Estas enfermedades producen manchas de color marrón en las hojas de las proteas. Normalmente se controlan con fungicidas como mancozeb y clortalonil.

Enfermedades bacterianas

- *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Esta enfermedad bacteriana causa manchas en las hojas de *Protea cynaroides* en viveros y plantaciones comerciales (Rohrbach, 1984). Las manchas son pequeñas de aproximadamente 5 mm de diámetro, color marrón oscuro o negro y, ocasionalmente se presentan hundidas (Jamieson et al., 1985).

Para el control de esta enfermedad pueden usarse los bactericidas que combaten esta bacteria en árboles frutales (Jamieson et al., 1985).

III. 3. ESTUDIO HISTOLÓGICO

III. 3. 1. Los tejidos en las plantas vasculares

Según Paniagua et al. (2007), los organismos vegetales multicelulares se disponen formando tejidos y órganos, pero éstos difieren según el nivel de organización. Las plantas superiores presentan una verdadera diferenciación celular en tejidos, es decir, un grupo de células de origen, estructura y funciones comunes. El conjunto de tejidos forman los órganos que componen la planta adulta.

Los tejidos pueden dividirse en dos grupos: simples y compuestos. Por otro lado, se pueden clasificar en meristemas, parénquima, mecánicos (de sostén), vasculares, protectores y secretores.

III. 3. 1. 1. Tejidos meristemáticos

Las plantas superiores conservan determinadas zonas de división, que son los meristemas, células con capacidad de aumentar el volumen de los órganos y multiplicar el número de estos. Son considerados como tejidos embrionarios que permiten el crecimiento, por su capacidad de división y diferenciación indefinidamente (Paniagua, 2007). Según Haber y Foard (1963) consideran la división celular como un proceso distinto del crecimiento, ya que no contribuye al aumento de tamaño de una estructura.

Las células que permanecen siempre meristemáticas reciben el nombre de células iniciales, y las que se diferenciarán después en las células de los demás tejidos se conocen como células derivadas. Sin embargo, algunas células pueden adquirir la capacidad meristemática en determinadas condiciones conocidos como meristemas secundarios. Por otro lado, están los meristemas remanentes, células entremetidas en tejidos diferenciados, donde permanecen inactivas hasta que en un determinado momento inician su actividad (Paniagua, 2007).

Fahn (1985) y Paniagua (2007), clasifican los meristemas en:

- Apicales. Se localizan en los extremos de las ramas del tallo y de las raíces. Son meristemas primarios.
- Laterales. Forman un cilindro alrededor de las ramas y raíces; este cilindro se sitúa en la parte más externa (felógeno) o a cierta profundidad, en el sistema vascular (cambium vascular). Son meristemas secundarios.
- Intercalares. Se sitúan entre los tejidos maduros. Son meristemas primarios.

Para la mayoría de los autores, los meristemas se dividen en:

- Meristemos primarios. Que pueden ser apicales e intercalares. Los apicales a su vez se dividen en caulinares y radicales.
- Meristemos secundarios (laterales). Posteriormente al crecimiento primario (en longitud), desarrollan un crecimiento secundarios (en espesor). Se distinguen el cambium vascular y el cambium interfascicular además del cambium suberoso o felógeno.

III. 3. 1. 2. Cambium vascular

El cambium vascular es el meristemo secundario que forma el floema y xilema secundario en tallos y raíces. Su origen puede estar en el procambium, el cual produce el floema y xilema secundario una vez finalizado el crecimiento primario, en vez de producir metafloema y metaxilema. Otra hipótesis sobre su origen es la desdiferenciación de tejidos parenquimáticos, válida en monocotiledóneas con crecimiento secundario y en el cambium interfascicular (que sin áreas con sistema vascular primario origina sistema vascular).

Se localiza inicialmente entre metafloema y metaxilema, no desapareciendo en el desarrollo del sistema vascular secundario y quedándose entre las últimas capas del xilema y floema.

Según la posición inicial del procambium puede estar en la planta como:

- Un cilindro. El sistema vascular que se origina tiene forma de cilindro continuo (xilema en interior y floema en exterior). Se observa en cortes transversales que la raíz o tallo se divide por un anillo completo en dos zonas.
- Cordones de células cambiales equidistantes en número variable (cambium fascicular). Entre los cordones suelen desarrollarse un cambium interfascicular, dando lugar finalmente, a un anillo continuo. Las divisiones de las células del cambium interfascicular pueden dar lugar a parénquima y xilema y floema.

Según la disposición de la célula nos podemos encontrar:

- Cambium estratificado. Las células se disponen en filas horizontales de tamaño similar y poco alargadas.
- Cambium no estratificado. Las células se disponen de forma desordenada y de longitud más variable. Es el más común.

Las células iniciales cambiales pueden ser alargadas y no solo de forma isodiamétrica, con abundantes vacuolas y con amiloplastos desarrollados. Hay dos tipos de estas células según su grado de alargamiento: las células iniciales fusiformes y células iniciales radiales.

Con respecto a su actividad, en periodo más activo como en primavera se observan estratos, mientras que en reposo de la planta como invierno se observa una capa de células cambiales.

Una de las funciones del cambium es la de formar tejido cicatricial (callo) sobre las heridas en tallos y raíces, por debajo o por encima de la superficie dañada. Este nuevo tejido está constituido por tejido parenquimatoso blando, que aparece rápidamente. Bajo el callo se desarrolla un cambium reorganizado produciendo tejidos vasculares nuevos.

III. 3. 1. 3. Tejidos parenquimáticos

Este tejido (fundamental) está formado por células parenquimáticas, células vivas de morfología y fisiología variables, la mayor parte de las veces con membranas de forma poliédrica. Los meristemos apicales y las células reproductoras son de naturaleza parenquimática.

Es la base de las actividades esenciales de la planta: fotosíntesis, respiración, almacenamiento, secreción, excreción (las actividades que requieren la presencia de protoplasma vivo).

Las células parenquimáticas son similares morfológicamente a las de los meristemos. Transcurrido varios años, las células parenquimáticas conservan su capacidad para dividirse aunque sean células maduras (alterando el medio), teniendo un papel fundamental en la regeneración y en la restauración de heridas. Se ha podido demostrar que pequeños grupos de células parenquimáticas, o incluso una sola de ellas, si se cultivan en medios adecuados, pueden llegar a originar plantas enteras que florecen y producen semillas viables (Steward, 1963; Steward et al., 1958, 1964, 1970).

Su origen podría ser en la planta por:

- Desarrollo primario: a partir del meristemo fundamental en el caso del parénquima de la corteza y de la médula, y a partir del procambium en el caso de sistema vascular primario.
- Desarrollo secundario: del cambium se originan el parénquima junto con a los componentes vasculares, mientras que de las divisiones de las mismas células parenquimáticas, del felógeno y si estuviera presente del cambium interfascicular, se origina el parénquima de la corteza y el de la médula.

Según Paniagua et al. (2007) los tipos de parénquima son:

- Parénquima asimilador o clorofílico: localizado debajo de la epidermis de la hoja. Está muy desarrollado y puede adquirir dos formas:
 - Parénquima en empalizada: constituido por células prismáticas, alargadas y con espacios intercelulares relativamente pequeños.
 - Parénquima lagunar: formado por células más redondeadas y con espacios intercelulares muy amplios, dejando grandes cámaras o lagunas entre sí. Estas células, en conjunto, adquieren una forma lobulada.

Existen también este tipo de parénquima en otros órganos no foliares de la planta, como en los tallos verdes, o en órganos accidentalmente expuestos a la luz.

- Parénquima de reserva. Esta función la ejercen parénquimas muy diversos situados en varios órganos de la planta. Su característica más destacada es la vacuola central, en la que se acumulan materiales de reserva en diversos estados. El núcleo es poco visible y queda rechazado a la periferia celular.

Los productos almacenados son muy diversos, aunque el más frecuente es el almidón (amiloplastos), además de proteína, inulina o azúcares disueltos. Más raramente se encuentran células parenquimáticas que acumulan taninos y otros derivados del fenol (en vacuolas e hialoplasma y hasta en la pared celular) o sustancias minerales cristalizadas. Por otro lado, pueden acumularse grasas y aceites que forman esferosomas en el hialoplasma.

- Parénquima aerífero. Las plantas acuáticas y las que crecen en lugares encharcados presentan grandes huecos entre cordones celulares anastomosados de células parenquimáticas.
- Parénquima acuífero. Es el parénquima en el que se almacena agua, como es el caso de las plantas xerófitas (plantas de climas secos).
- Otros tipos de parénquima. Células que forman parte de otros tejidos, como los del parénquima liberiano y leñoso, las células subepidérmicas, corticales y otras como las células de transferencia.

III. 3. 1. 4. Tejidos mecánicos o de sostén

Los tejidos mecánicos o de sostén de las plantas son el colénquima y el esclerénquima. Ambos se denominan estereoma.

Colénquima

Es un tejido vivo formado por células generalmente alargadas y con una membrana gruesa no lignificadas, que se halla en los órganos en vías de crecimiento preferentemente (tallos, hojas, peciolo, frutos, etc.) o en órganos maduros de plantas herbáceas. Nunca está en la raíz en condiciones normales.

Según Paiva y Machado (2003), el viento influye en el engrosamiento de las paredes de las células del colénquima. De igual modo la exposición a la luz de las raíces provoca la aparición de colénquima. Este puede engrosarse y se convierte en esclerénquima, o adelgazarse secundariamente y como consecuencia, estas células pueden ser de nuevo meristemáticas y dividirse.

Para algunos autores, a partir del meristemo fundamental se desarrolla el crecimiento primario de la planta, el colénquima. Sin embargo, para otros éste se desarrolla a partir del procambium.

Todas las paredes de las células epidérmicas se engrosan de forma similar a las del colénquima. Otras veces, éste puede desarrollarse en una aposición inmediatamente subyacente a la epidermis o más profundamente.

Paiva y Machado (2003), señalaron que en los tallos, puede formar un círculo completo, o bien bandas longitudinales. Mientras que en las hojas aparece en uno o en ambos lados de las venas y a lo largo de los márgenes del limbo.

Paniagua et al. (2007) clasificaron el colénquima según el modo en que aumenta de grosor las paredes celulares. El engrosamiento comienza siempre en los ángulos y se extiende en grados muy diversos al resto de la pared. Se distinguen los siguientes tipos: colénquima anular, colénquima angular, colénquima lagunar y colénquima laminar.

Las plantas poseen una notable resistencia mecánica debido a que el colénquima presenta una buena resistencia a la tracción. Las paredes (que carecen de lignina) podrían estirarse si esta tracción es fuerte.

Cuando los órganos crecen en grosor y envejecen, las células se endurecen y la pared adquiere gran resistencia pasando a formar esclerénquima.

Esclerénquima

Es el tejido de sostén de los órganos adultos que ya no crecen y su desarrollo está controlado por factores hormonales (Evert y Eichhom, 2007).

Su resistencia es mayor que el colénquima, debido a que las células que lo constituyen junto a la pared primaria celulósica crean una pared secundaria gruesa y dura, debido a la acumulación de lignina (lignificación).

Es muy importante en la formación de los órganos axiales de la planta.

Se pueden distinguir dos tipos de células:

- Esclereidas o células pétreas

Derivan de células meristemáticas o parenquimáticas en las que ha comenzado a depositarse pared secundaria, para posteriormente hacerla lignina, comenzando por los ángulos de la célula, sobre la pared primaria y la lámina media. Más tarde se lignifica la pared secundaria que contiene menor proporción de lignina. Las células conservan su forma primitiva (isodiamétrica), pero se engruesan y queda una luz celular muy reducida.

Pueden presentarse aisladas o formando grupos de número variable.

Se localizan en la medula de tallos y raíces y en la corteza, además de en el mesófilo de hojas, frutos y en las semillas (cubierta).

Según Paniagua et al. (2007), se clasifican:

a) Por su origen, que es diverso:

- Las esclereidas de la corteza o médula que pueden formarse a partir del parénquima, del meristemo fundamental o incluso del felógeno.
- Las que se encuentran entre los componentes del sistema vascular se originan junto con éstos del procambium o del cambium vascular.
- Las de la cubierta de semillas son de origen protodérmico.

b) Por su forma: astroesclereidas, braquiesclereidas, macroesclereidas, osteoesclereidas y tricoesclereidas.

- Fibras

Son aquellas que se forman a partir de las células meristemáticas, pero acaban de forma alargadas con menos punteaduras que las células pétreas (más anchas y de apertura más alargada) y con luz celular muy escasa.

Se encuentran en todos los órganos de la planta.

La capa más interna de la pared de las fibras es capaz de absorber y almacenar agua para resistir la sequía, importante en algunas plantas de climas áridos.

Las que se hallan en el xilema se denominan fibras del xilema (xilemáticas). Pueden ser: *fibras libriformes, fibras septadas y fibrotraqueidas.*

Las que están fuera del xilema se denominan fibras extraxilemáticas. Su pared celular presenta más grosor que las fibras del xilema y con alternancia de capas (ligninas y celulosa). Las que se encuentran en el floema se denominan *fibras del floema o liberianas*, las que se encuentran en la corteza del tallo y la raíz *fibras corticales* y las que se localizan en la periferia del cilindro vascular *fibras perivasculares.*

III. 3. 1. 5. Tejidos vasculares: xilema y floema

Los tejidos vasculares son característicos de las plantas superiores (plantas vasculares). Constituyen un sistema distribuido por toda la planta por la que discurre el agua y todas las sustancias disueltas en ellas.

El xilema y el floema están unidos formando una red de tubos a través de todo el vegetal y en todas las direcciones: el sistema cribovasal o liberoleñoso.

Xilema (leño)

Es el que desde la raíz (donde se absorbe el agua por ósmosis) transporta a toda la planta, a través de tubos capilares, el agua y todas las sustancias disueltas en ella.

Células alargadas de paredes lignificadas y engrosadas con forma de tubo, y sin contenido citoplasmáticos son los principales elementos conductores del xilema. Esta forma le confiere solides y resistencia.

Está compuesto por elementos no vasculares (parénquima axial y radiomedular y fibras esclerenquimáticas (fibras del xilema)) y elementos vasculares (tráqueas y traqueidas).

El origen del xilema primario es a partir del procambium durante el crecimiento primario, en primer lugar el protoxilema y luego el metaxilema. Después, a partir del cambium vascular o también interfascicular, durante el crecimiento secundario se forma el xilema secundario.

Floema (líber)

Este tejido reparte, por toda la planta desde su lugar de producción, los nutrientes orgánicos, especialmente los azúcares producidos en la fotosíntesis, hasta donde son consumidos o almacenados.

Está compuesto por elementos no vasculares (células anexas o acompañantes, células albuminíferas, parénquima axial y radiomedular y fibras esclerenquimáticas (fibras del floema)) y elementos vasculares (tubos cribosos y células cribosas).

El floema primario se forma a partir de procambium durante el crecimiento primario (primero el protofloema y luego el metafloema). Después, a partir del cambium vascular, durante el crecimiento secundario, se forma el xilema secundario.

III. 3. 1. 6. Tejidos protectores

La epidermis es uno de los tejidos protectores (capa celular más externa) y que recubre el vegetal formando una barrera frente al medio externo. Sus funciones principales son: intercambio y regulación de la transpiración (a través de los estomas), entre la planta y el ambiente y servir de defensa frente agentes externos físicos y seres vivientes.

El origen de la epidermis es diversos, dependiendo del tipo de planta.

En la mayoría de las plantas la epidermis consta de una sola capa de células (epidermis simple), aunque existen epidermis con varias capas (estratificadas).

La cutícula es la capa que poseen las células epidérmicas, sobre la pared celular en contacto con el medio externo, y que está formada por una sustancia lipídica (cutina, que varía según la parte de la planta). Esta se forma durante el estadio inicial del crecimiento de los órganos y se encuentra en las hojas, tallos y porciones maduras de la raíz. Es impermeable al agua y refleja parte de las radiaciones solares.

Los estomas son aberturas a través de la epidermis por las que se comunican las zonas profundas de tallo y hojas (donde son muy abundantes) con el exterior (aire). Permiten la entrada de CO₂ y la salida del agua de la planta.

Los tricomas o pelos son células muertas vacías de contenido o bien células vivas y suelen estar revestidos de cutícula. Están formados a partir de células del estrato epidérmico que se alargan o proliferan y cuyas funciones son: soporte, absorción de agua, elaboración de secreciones y protección. Se pueden encontrar pelos unicelulares o pluricelulares y prominencias (emergencia) o pelos radicales.

III. 3. 2. Familia Proteaceae. Histología de la hoja

La morfología y anatomía de las hojas de las Proteaceae es muy diversa. Morfológicamente las hojas juveniles y adultas, en algunas especies, es distinta (Venkata Rao, 1971). Groom et al. (1997) manifiesta que las del género *Hakea*, poseen hojas jóvenes en teretes (hojas con agujas, normalmente circulares en sección transversal) y hojas adultas planas, con distintos tipos de lámina.

La mayor parte de las descripciones existentes, corresponden a plantas de géneros y especies australianas en las que se ha abordado el estudio de diferentes aspectos anatómicos, aunque también en especies de Sudamérica (Torres 1998; González et al., 2004) y de Japón (Hasegawa et al., 2010). Actualmente se han estudiado también algunas especies sudafricanas (Suárez, 2015; Vera Batista, 2016).

En un corte transversal, los estudios realizados se basan en la comparación de los siguientes caracteres morfológicos: epidermis adaxial y abaxial, cutícula, estomas, tricomas, características del mesófilo, esclereidas (tipos, disposición y posición), haces vasculares (nervio central) y fibras del haz (Vera Batista, 2016).

La epidermis presentó diferencias, no solo entre los distintos tipos de especímenes estudiados, sino también en cuanto a su posición (Vera Batista, 2016). Según González et al. (2004) una de las características relevantes de la epidermis de algunas especies de Proteaceae (*Lobata dentata*, *Lomatia ferruginea* y *Orites myrtoidea*) es la presencia de células epidérmicas con paredes celulares papiliformes en superficie abaxial. Torres (1998), además, observó epidermis adaxiales con paredes anticlinales rectas y engrosadas en *Embothrium coccineum* y *Lomatia dentata*, en otros casos, las células epidérmicas de la superficie adaxial presentan septos en *Grevuina avellanna*, *Orites myrtoidea* y *Panopsis polystachy*.

En algunas especies argentinas de la familia Proteaceae se observaron células epidérmicas orientadas al azar sin ornamentación en *Embothrium coccineum* y con ornamentación en *Gevuina avellana*, *Lomatia hirsuta* y *Orites myrtoidea* (González et al., 2004).

La existencia de especies, como *Grevillea aspera*, en las que la cutícula es más gruesa en la superficie adaxial que en la abaxial, refuerza la hipótesis de Dillon (2002), en la que incluye a la cutícula dentro de las características escleromórficas de las proteas, aunque es considerada también un elemento protector frente a la radiación solar (Jordan et al. 2005). En el género *Hakea* exhibieron cutículas gruesas, tanto en hojas terete como anchas (Groom et al. 1994; 1997). Además, Teixeira et al. (2008) observó menor grosor en las hojas jóvenes en comparación con las adultas. El grosor cuticular depende de si las hojas son apicales, medias o basales para los cultivares *Leucospermum cordifolium* 'Flame Spike' y *L.* 'Tango' (Suárez, 2015). Catling (2010) manifestó que en especies del género *Finschia*, la superficie abaxial estaba cubierta de gránulos de cera.

Los estomas de las Proteaceae estudiadas hasta el momento presentan estomas braquioparacíticos, excepto en *Bellendena* que son laterocíticos (Carpenter et al., 2005).

Las hojas de algunas especies pueden ser hipoestomáticas como *Embothrium coccineum*, *Grevillea avellana*, *Lomatia dentata*, *Lomatia ferruginea*, *Lomatia hirsuta*, *Orites myrtoidea*, *Roupala brasiliensis* y *Roupala meisneri* (González et al., 2004), y anfiestomáticas como el cultivar *Protea* 'Susara' (León et al., 2014), *Leucospermum cordifolium* 'Flame Spike' (Suárez, 2015), *Leucospermum patersonii* y *Leucospermum* 'Sucesion I' (Vera Batista, 2016).

Los tricomas son otro tipo de células epidérmicas, conjuntamente con las células epidérmicas propiamente dichas y los estomas. En esta familia pueden estar presentes en ambas superficies, como en *Lomatia dentata*, *Lomatia ferruginea*, *Lomatia hirsuta*, *Roupala brasiliensis*, *Roupala meisneri*, o únicamente en un lado, como en *Embothrium coccineum* que presentan los tricomas en la superficie adaxial y *Orites myrtoidea* sólo en la abaxial (González et al., 2004). Catling (2010) citó la presencia de pequeños tricomas glandulares en *Finschia chloroxantha*, pero generalmente, los estudiados son simples y multicelulares.

Las hojas presentan mesófilo, formado por células parénquimáticas en empalizada, entre las cuales se encuentran osteosclereidas y una vaina del haz esclerenquimatosa rodeando cada haz vascular (Suárez, 2015). Teixeira et al. (2008) señaló que las hojas de *Hakea* presentan diferente morfología según su edad, y en el caso del mesófilo, las hojas anchas tienen 1 o 2 capas de células del parénquima en empalizada, pero sólo las especies con dos capas (*H. cyclocara*, *H. cygna* y *H. postrata*) poseen esclereidas.

Sin embargo, León et al. (2014) diferenciaba, en el mesófilo, el parénquima en empalizada y esponjoso y cuyas células presentaban depósitos fenólicos en su interior en *Protea* ‘Susara’.

Catling (2010) expuso que en *Finschia chloroxantha* y *F. rufa* las células epidérmicas y las del mesófilo tenían inclusiones cristalinas y taninos.

Los haces vasculares en esta familia no están muy estudiados. Torres (1998) destacó la existencia de haces colaterales en *Gevuina avellana*, *Orites myrtoidea*. Estos tipos de haces se observaron en *Protea* ‘Susara’, además de presentar depósitos de fenoles en el parénquima asociado a éstos (León et al., 2014). En *Leucospermum cordifolium* ‘Flame Spike’ y *L.* ‘Tango’ los haces centrales y secundarios eran colaterales y el cambium vascular estaba constituido por 2-3 capas, con depósito de fenoles en forma de gotas más o menos dispersas (Suárez, 2015).

III. 3. 3. Familia Proteaceae. Histología del tallo

Cuando nos referimos al tallo, la información histológica es muy escasa. Las descripciones corresponden a especies australianas (Catling, 1996) y a cultivares sudafricanos, pero cuyo cultivo se ha desarrollado en Tenerife (Islas Canarias) (Suárez, 2015; Vera Batista, 2016).

El tallo de *Finschia chloroxantha* presenta epidermis desorganizada, con córtex compuesto por 5-11 capas de células, con grupos de células pétreas y algunas células con taninos, además de formar un anillo más o menos continuo de esclerénquima (Catling, 2010).

En cuanto a la epidermis de los tallos del género *Grevillea* presentaron numerosos tricomas y córtex formado de parénquima no lignificado, de 2-7 capas celulares; las células pétreas estaban bien desarrolladas y se observaron taninos en las células corticales.

En la especie estudiada, *Hakea arborescens*, el súber del tallo fue superficial. El córtex no estaba lignificado y estaba compuesto de células parenquimáticas (2-8 capas) y fibras de pared gruesa. En este espécimen también se observaron células pétreas, coincidiendo con los radios medulares.

León et al. (2014) realizaron un estudio más amplio de la anatomía del tallo de *Protea* ‘Susara’, haciendo hincapié en la presencia de compuestos fenólicos en algunos tejidos. La epidermis presentaba sustancias fenólicas en sus células y cutícula lisa y gruesa. El colénquima

subepidérmico, además del parénquima cortical, presentaban fenoles en su interior. El córtex presentaba células pétreas y haces vasculares colaterales con fibras de esclerénquima perivasculares. La presencia de compuestos fenólicos en los diversos tejidos pueden tener una función protectora frente a la radiación ultravioleta (León et al., 2014).

Suárez (2015) describió los tallos de los cultivares *Leucospermum cordifolium* ‘Flame Spike’ y *L.* ‘Tango’, cuya epidermis era simple y con ausencia de depósitos de fenoles en el lumen celular epidermal. Los tricomas eran simples y alargados. El colénquima angular y córtex parenquimático, presentaban capas que variaban para ambos cultivares. Las fibras del esclerénquima eran perivasculares con paredes engrosadas y haces vasculares colaterales.

Vera Batista (2016) describió los tallos de *Leucospermum patersonii* de epidermis simple con cutícula lisa y gruesa, al igual que en *Leucospermum* ‘Sucesion I’. Los tricomas presentaban cabeza unicelular. El colénquima subepidérmico no era uniforme en todo el perímetro del tallo. Entre las células del córtex parenquimático se presentaban células pétreas individuales o agrupadas.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

IV. PARTE EXPERIMENTAL

IV. 1. ENSAYO I: Efecto del etanol, peróxido de hidrógeno, IBA y combinación de los mismos sobre el enraizamiento de las estacas de *Leucospermum* 'Spider'

IV. 1. 1. Materiales y métodos

El ensayo se realizó en las instalaciones de la Sección de Ingeniería Agraria de la Escuela Politécnica Superior de Ingeniería (EPSI), situada en el Término Municipal de La Laguna. El material vegetal utilizado, estacas terminales de madera semidura de unos 15 a 22 cm de longitud, provenían de 7 plantas madres de 5 años de edad, de *Leucospermum* 'Spider', cultivadas en las parcelas experimentales de dicha Sección. La recolección del material vegetal se realizó a primeras horas de la mañana, el día 24 de febrero de 2016.



Fotografía 8.- *Leucospermum* 'Spider' en cultivo.

Una vez recolectadas las estacas, se prepararon dejándolas a una longitud adecuada y eliminándoles el botón floral y las hojas inferiores de las 2/3 partes de su base. Posteriormente, se les refrescó el corte, eliminándoles 1 cm de su extremo basal, y ya totalmente preparado el material vegetal, se sometió a los diferentes tratamientos.



Fotografía 9.- Estacas de madera semidura de *Leucospermum* 'Spider'.

Los tratamientos fueron:

- Tratamiento 1: etanol al 50% (control) (Tr1).
- Tratamiento 2: 2000 ppm de IBA (Tr2).
- Tratamiento 3: 4000 ppm de IBA (Tr3).
- Tratamiento 4: peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 3,5% (Tr4).
- Tratamiento 5: peróxido de hidrogeno (H_2O_2) + 2000 ppm de IBA (Tr5).
- Tratamiento 6: peróxido de hidrogeno (H_2O_2) + 4000 ppm de IBA (Tr6).

Estos se aplicaron a los 2 mm basales de las estacas. Los tratamientos se aplicaron en forma líquida. Posteriormente las bases de las estacas se pasaron por una mezcla de talco y fungicida (Carbendazima 50%).

Se utilizaron 20 estacas por tratamiento. El número total de estacas fue de 120, del cultivar indicado anteriormente.



Fotografía 10.- Preparación de los tratamientos aplicados en este ensayo.

Las estacas se plantaron en bandejas, previamente desinfectadas, que contenían un sustrato compuesto por gránulos de poliestireno y de fibra de coco (3:1), que se colocaron en un invernadero de cristal ubicando en la Sección de Ingeniería Agraria de la EPSI dotado de un sistema automatizado para el control de la temperatura y humedad ambiental, mediante “fog system”. En el programador del sistema se fijaron las siguientes condiciones ambientales:

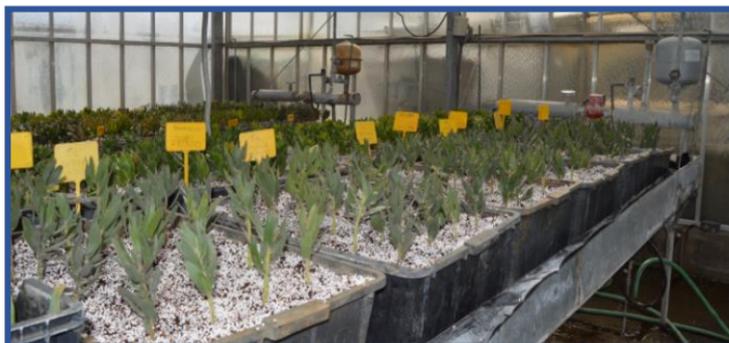
- Humedad relativa del 70%.
- Temperatura de 16°C.



Fotografía 11.- Estacas colocadas en las bandejas de propagación.

En el caso de registrarse humedades inferiores a la establecida, el sistema entraba en funcionamiento realizando nebulizaciones de agua durante 60 segundos cada 3 minutos hasta alcanzar el valor de 70%. En el caso de registrarse temperaturas cercanas a 25°C se abría automáticamente la ventana lateral de la instalación y si se superaban los 30°C se ponía en funcionamiento el ventilador de la misma, que facilitaba la extracción de aire caliente para reducir la temperatura.

Las bandejas se situaron sobre una mesa de enraizamiento dotada de calor de fondo, por un circuito cerrado de agua caliente, que permitía mantener una temperatura del sustrato de aproximadamente $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Dicha temperatura se controlaba mediante un termómetro.



Fotografía 12.- Vista panorámica de la colocación de las bandejas.

En la cubierta del invernadero se dispuso una malla de sombreo que proporcionó una reducción en la radiación recibida por el cultivo del 50%.

A las seis semanas desde el comienzo del ensayo, se empezó a realizar conteos en semanas alternas (cada 14 días), empezando el día 6 de abril de 2016 y acabando el día 13 de julio de 2016. En los mismos se procedió a contabilizar el número de estacas:

- Muertas.
- Sin callo.
- Con callo.
- Con raíces, pero no trasplantables.
- Raíz trasplantable.

Considerando como estacas trasplantables aquellas cuyo cepellón tenía un volumen similar a la mitad de una pelota de tenis, cuyo radio es de unos 3,5 cm. A éstas últimas se les midió la longitud de las tres raíces más largas superiores a 3,5 cm, así como el número de raíces del cepellón.

Además, se elaboró un índice de enraizamiento (IE), cada dos semanas a partir de la 6ª semana, desde la plantación para reflejar la calidad del sistema radicular observado, la valoración se realizó de acuerdo a lo postulado por Criley y Parvin (1979) de acuerdo a la siguiente escala:

0 = Estacas muertas.

1 = Sin callo.

2 = Con callo.

- 3 = Con raíces, pero no trasplantables.
- 4 = Trasplantables con pocas raíces (3-6 raíces).
- 5 = Trasplantables con número medio de raíces (6-10 raíces).
- 6 = Trasplantables con numerosas raíces (más de 10 raíces).

Las estacas una vez consideradas trasplantables, se pasaron a bolsas plásticas de polietileno de color negro de 12 cm de diámetro con un sustrato compuesto por una mezcla de turba y picón en la proporción de 1:3 (v/v).

La duración del ensayo fue de 20 semanas, realizándose 8 conteos en total. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando el software SPSS 19.0 para Windows, de la siguiente forma:

- La cantidad de estacas trasplantables fueron evaluadas mediante una prueba de hipótesis con chi-cuadrado.
- La longitud de las raíces de las estacas trasplantables y el índice de enraizamiento (este último previa transformación del arco seno) se sometieron a análisis de varianza, considerando a cada estaca como una replicación de cada tratamiento.

IV. 1. 2. Resultados y discusión

IV. 1. 2. 1. Evolución de las estacas

La evolución de las estacas del cultivar *Leucospermum* 'Spider' durante el experimento se describe a continuación:

- **Estacas muertas**

A las 6 semanas desde el inicio del ensayo se contabilizó un 5% de estacas muertas correspondientes a los tratamientos 1 (etanol 50%) y 6 (peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA). (Fig. 13).

Dicho porcentaje aumentó ligeramente en las siguientes semanas alcanzando en la semana 10 un valor del 10% en el Tr1 y un 5% en los tratamientos 2 (2000 ppm de IBA) y 3 (4000 ppm de IBA) (Fig. 13).

En la semana 16 se contabilizó un 10% en el tratamiento 6 (peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA) y en la semana 18 un 10% correspondiente al Tr3 (Figs.14-15).

Al final del experimento, a las 20 semanas, los porcentajes fueron idénticos a los anteriores, alcanzando un valor de 10% en los tratamientos 1 (etanol 50%), 3 (4000 ppm de IBA) y 6 (peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA); 5% en el Tr2. En los tratamientos 4 y 5 no se contabilizaron estacas muertas (Fig. 15).

- **Estacas sin callo**

A las 6 semanas del comienzo del ensayo se observó un alto porcentaje de estacas sin callo en todos los tratamientos, excepto en el Tr4. El valor más alto (45%) corresponde al Tr1 (Fig.13).

En las siguientes semanas los porcentajes disminuyeron de forma progresiva, mostrando al final del ensayo, a las 20 semanas, un valor de 20% en el Tr1 (Figs. 14-15).

- **Estacas con callo**

A las 6 semanas desde el inicio del ensayo los tratamientos 1, 4, 5 y 6 presentaban estacas con callo en su base y en las heridas donde se eliminaron las hojas, correspondiendo los mayores porcentajes a los tratamientos 4 (peróxido de hidrógeno) y 1 (etanol 50%), con un valor de 45% y 35 %, respectivamente (Fig. 13).

En la semana 8 aparece un 5% de estacas del Tr2 (Fig. 13).

Dichos porcentajes aumentaron de forma progresiva en las siguientes semanas hasta que, en la 16, se alcanzó el máximo valor en la mayor parte de los tratamientos: 55% en el Tr1; 15% en el Tr4; y 5% en los tratamientos 2 (2000 ppm de IBA), 5 (peróxido de hidrógeno + 2000 ppm de IBA) y 6 (peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA). A partir de ahí descendió hasta alcanzar al final del estudio, un valor del 35% en el Tr1; 10% en el Tr4; y 5% en el Tr5; mientras que para el Tr2 y Tr6 no se contabilizaron callos desde la semana 18 (Fig. 14).

En el transcurso del ensayo, no se contabilizó estacas con callo en el Tr3 (Figs. 13-14-15).

- **Estacas con raíces pero no trasplantables**

A las 6 semanas desde el inicio del ensayo se contabilizó las primeras estacas con raíces no trasplantables en todos los tratamientos, un 90% correspondientes al Tr2; 70% en el Tr3; 65% en el Tr5; 55% en los Tr4 y 6 (peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA); y un 15% en el Tr1 (etanol 50%) (Fig. 13).

En la semana 8, aumentaron en los tratamientos Tr1 y 4 (peróxido de hidrógeno), en un 25% y 70%, respectivamente. Sin embargo, en los otros tratamientos los porcentajes iniciales fueron disminuyendo (Fig. 13).

En la semana 10, todos los tratamientos descendieron sus porcentajes, excepto el Tr1 que aumentó al 30% (Fig. 13).

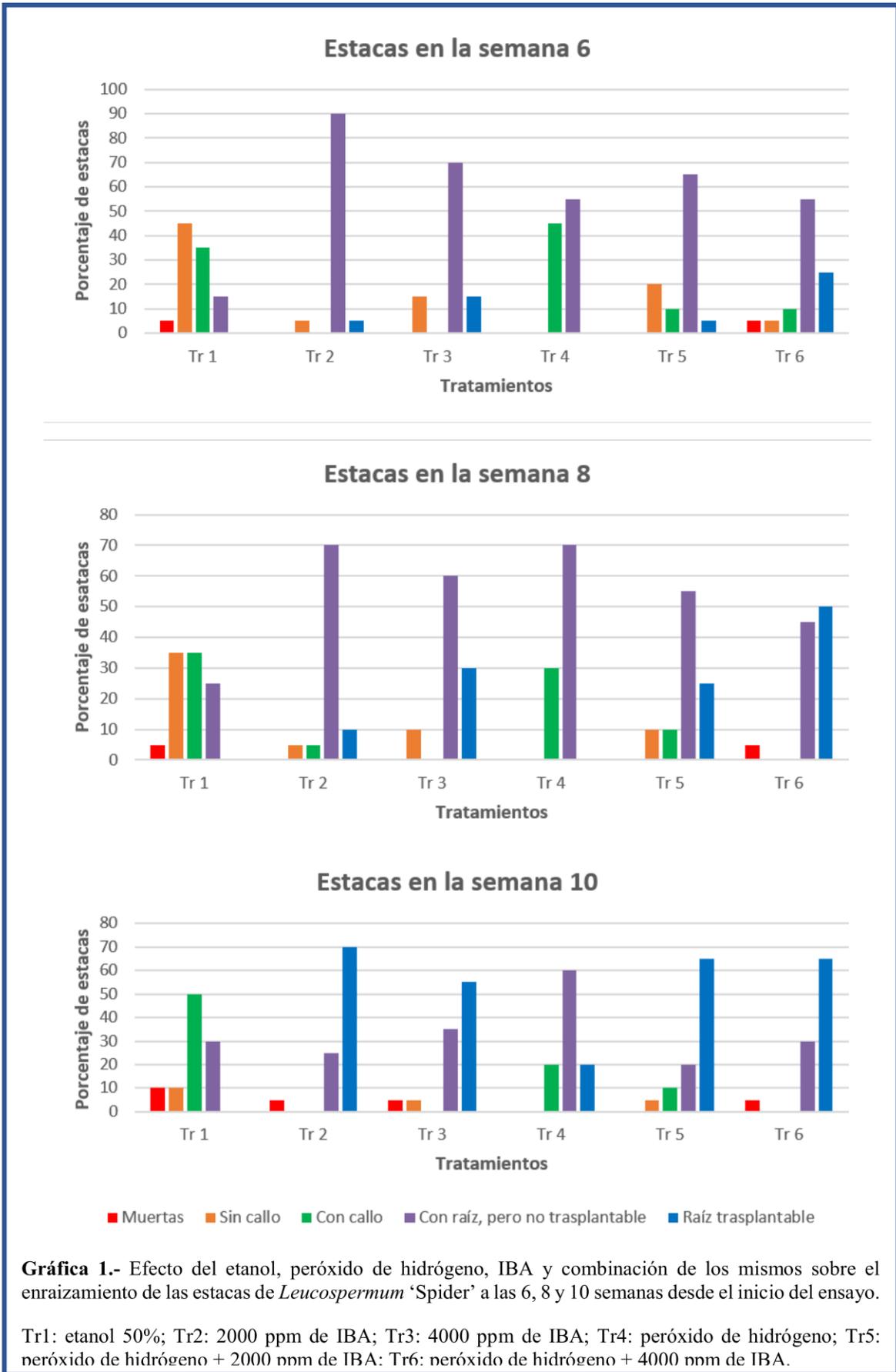
Los porcentajes aumentaron de forma progresiva, en el tratamiento 1, alcanzando el máximo valor en la semana 12 (40%) y, a partir de ahí decreció, obteniéndose al final del ensayo un porcentaje del 30% en el Tr4; 25% en el Tr1; 10% en el Tr3; y 5% en los tratamientos 2 (2000 ppm de IBA) y 6 (peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA). Desde la semana 14 no se contabilizó estacas con estas características en el Tr5 (Figs. 14-15).

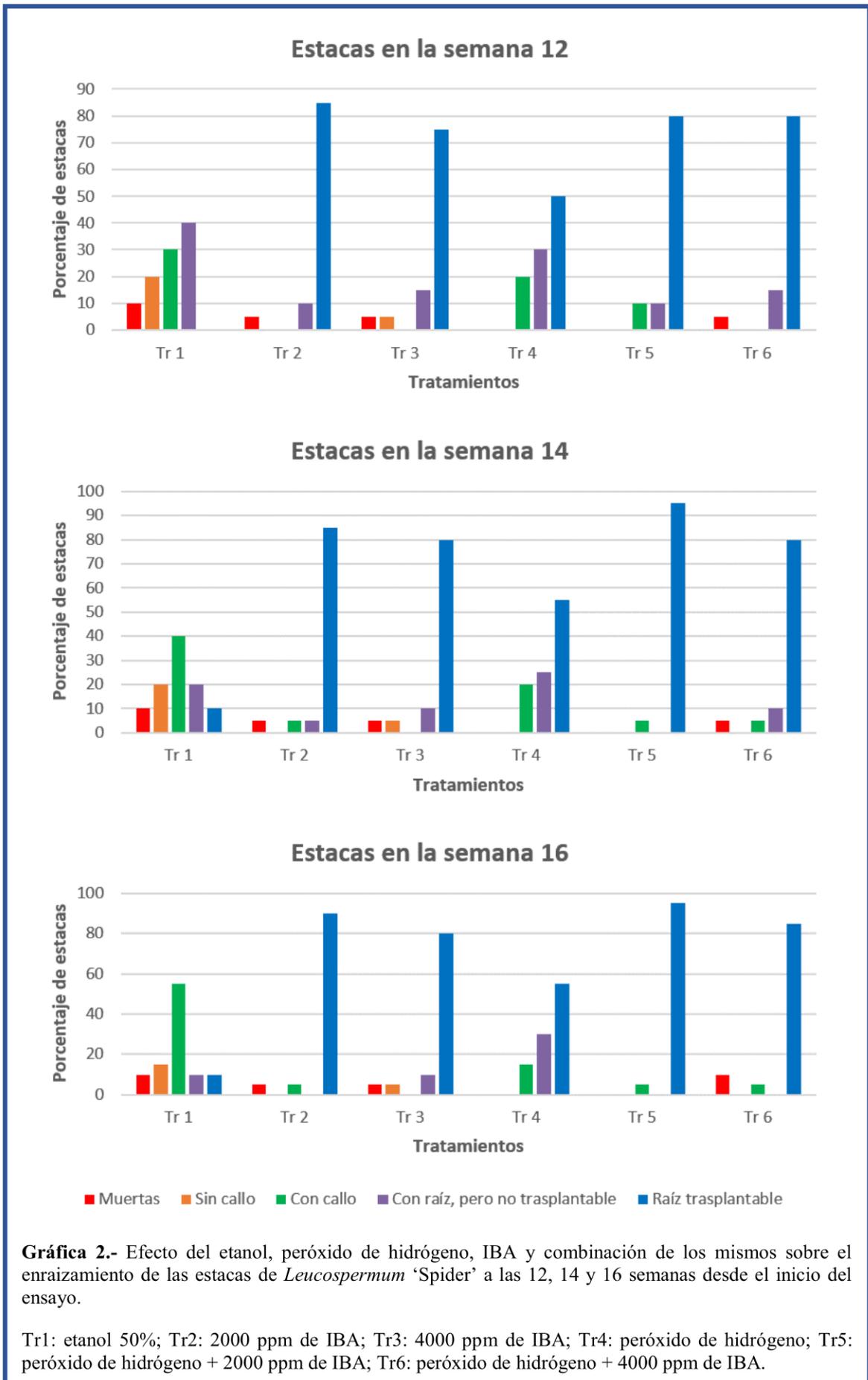
- **Estacas trasplantables**

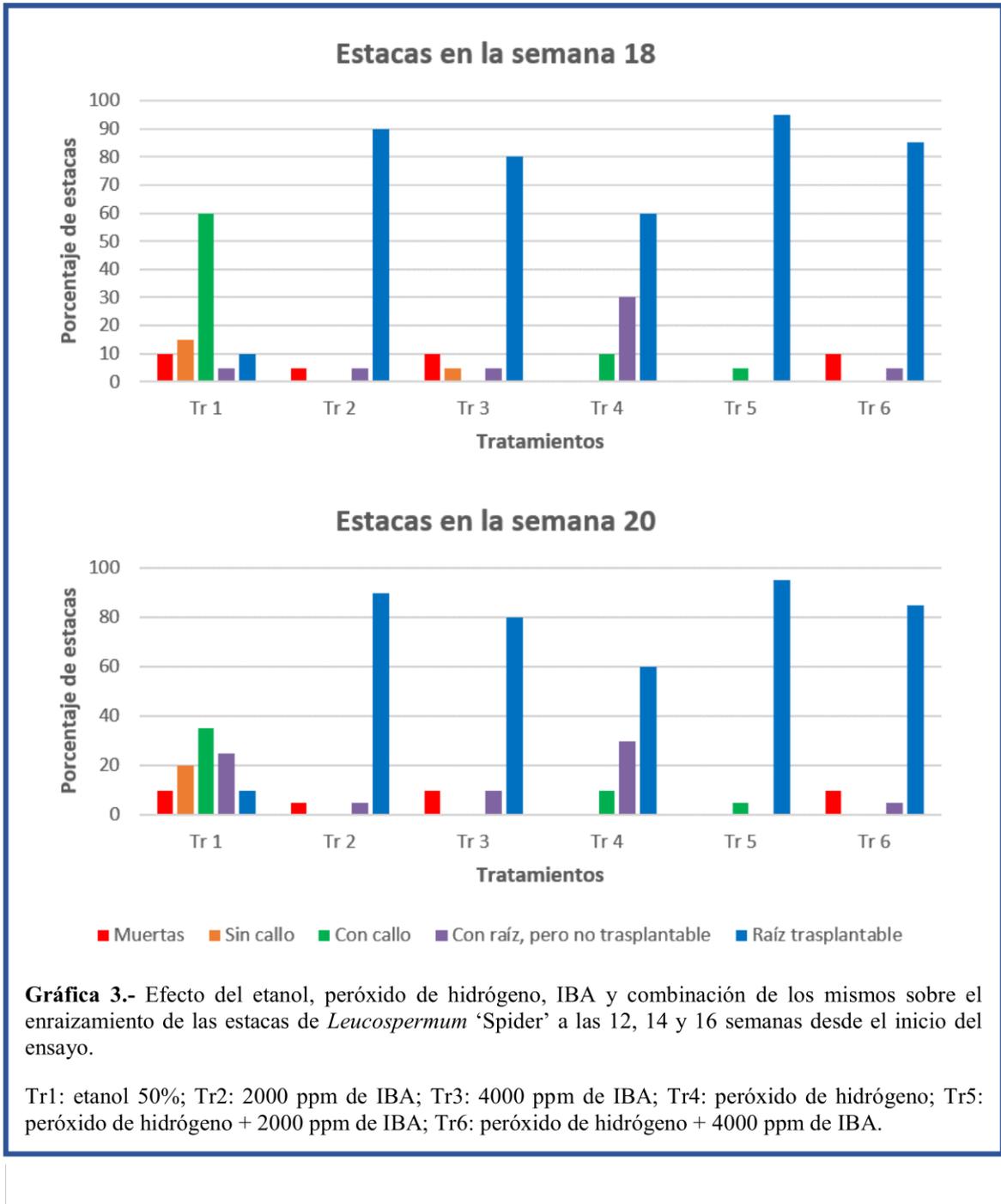
En la semana 6 desde el inicio del ensayo se contabilizó un 25% de estacas trasplantables en el Tr6 (peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA); 15% en el Tr3 (4000 ppm de IBA); y un 5% en los tratamientos 2 (2000 ppm de IBA) y 5 (peróxido de hidrógeno + 2000 ppm de IBA) (Fig. 13).

A las 10 semanas se observó un 20% de las estacas en el Tr4 (peróxido de hidrógeno), y en la 14 un 10% en el Tr1 (etanol 50%) (Fig. 13-14).

Dichos porcentajes aumentaron de forma progresiva hasta alcanzar los mayores valores en la semana 18, con un 95% en el Tr5 (peróxido de hidrógeno + 2000 ppm de IBA); 90% en el Tr2 (2000 ppm de IBA); 85% en el Tr6 (peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA); 80% en el Tr3 (4000 ppm de IBA); 60% en el Tr4 (peróxido de hidrógeno). El porcentaje de estacas no aumento para el Tr1 (etanol 50%) desde la semana 14 (Fig. 15).







IV. 1. 2. 2. Análisis estadístico de los datos obtenidos en el ensayo

IV. 1. 2. 2. 1. Estacas trasplantables

Los datos obtenidos a lo largo del ensayo se sometieron a una prueba de hipótesis chi-cuadrado, para comprobar que los datos observados y esperados fueran iguales o, si por el contrario, dependían de los diversos tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1.- Frecuencia de estacas trasplantables observadas frente a estacas trasplantables esperadas a las 20 semanas desde el comienzo del ensayo.

Semanas	Estacas trasplantadas	Tratamientos					
		Tr1	Tr2	Tr3	Tr4	Tr5	Tr6
6	Observadas	0	1	3	0	1	5
	Esperadas	20	20	20	20	20	20
8	Observadas	0	2	6	0	5	10
	Esperadas	20	20	20	20	20	20
10	Observadas	0	14	11	4	13	13
	Esperadas	20	20	20	20	20	20
12	Observadas	0	17	15	10	16	16
	Esperadas	20	20	20	20	20	20
14	Observadas	2	17	16	11	19	16
	Esperadas	20	20	20	20	20	20
16	Observadas	2	18	16	11	19	17
	Esperadas	20	20	20	20	20	20
18-20	Observadas	2	18	16	12	19	17
	Esperadas	20	20	20	20	20	20

Tr1: Etanol 50%; Tr2: 2000 ppm de IBA; Tr3: 4000 ppm de IBA; Tr4: peróxido de hidrogeno; Tr5: peróxido de hidrógeno+ 2000 ppm de IBA; Tr6: peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA.

Se observó que, desde el inicio del ensayo hasta el final del mismo, la probabilidad de la prueba χ^2 fue menor que la probabilidad estimada (0,05), por lo que no todos los datos de la población fueron iguales, sino que dependían del tratamiento.

También, se realizó una prueba de hipótesis chi-cuadrado con tablas de contingencia para comprobar la independencia de cada tratamiento de los resultados obtenidos.

Tabla 2.- Efecto del etanol, peróxido de hidrógeno, IBA y combinación de los mismos sobre el porcentaje de estacas trasplantables de *Leucospermum* ‘Spider’.

Semanas	Tratamientos					
	Tr1	Tr2	Tr3	Tr4	Tr5	Tr6
6	0b	5ab	15ab	0b	5ab	25a
8	0b	10bc	30ac	0b	25a	50a
10	0d	70a	55a	20bc	65a	65ab
12	0c	85a	75ab	50b	80a	80a
14	10c	85a	80ab	55b	95a	80ab
16	10c	90a	80ab	55b	95a	85a
18	10c	90a	80ab	60b	95a	85ab
20	10c	90a	80ab	60b	95a	85ab

Tr1: etanol 50%; Tr2: 2000 ppm de IBA; Tr3: 4000 ppm de IBA; Tr4: peróxido de hidrógeno; Tr5: peróxido de hidrógeno + 2000 ppm de IBA; Tr6: peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA. Los valores seguidos de las mismas letras dentro de la misma fila no son significativamente diferentes al nivel del 5%.

Del análisis de los resultados obtenidos se desprende que en la semana 6 el tratamiento que obtuvo un mayor porcentaje fue el Tr6 (peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA), seguido de los tratamientos 3 (4000 ppm de IBA), 2 (2000 ppm de IBA) y 5 (peróxido de hidrógeno + 2000 ppm de IBA), no existiendo diferencias significativas entre ellos (Tabla 2).

En la semana 8, el Tr6 (peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA) alcanzó un valor de 50%, seguido del Tr3 (4000 ppm de IBA) con un 30% y Tr5 (peróxido de hidrógeno + 2000 ppm de IBA) con un 25%, no existiendo diferencias significativas entre ellos.

En las siguientes semanas se aumentaron los valores en algunos tratamientos, y, al final del ensayo, el mayor porcentaje lo mostró el Tr5 (peróxido de hidrógeno + 2000 ppm de IBA) con un valor de 95%, seguido de los tratamientos 2 (2000 ppm de IBA) con un 90%; 6 (peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA) con un 85% y 3 (4000 ppm de IBA) con un 80%, no existiendo diferencias significativas entre ellos.

IV. 1. 2. 2. 2. Longitud de las raíces en estacas trasplantables

Los promedios de la longitud de las tres raíces mayores de 3,5 cm de longitud en estacas trasplantables, desde la semana 6 desde el inicio del ensayo hasta la finalización del mismo en la semana 20, se sometieron al análisis de varianza y posterior separación de medias por el método de Duncan al nivel del 5%.

Después de separar las medias se observó que desde la semana 6 hasta la 20 existieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. En la semana 6, el Tr6 (peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA) fue significativamente mayor al resto de los tratamientos, con un valor de 2,83 cm.

El Tr6 presentó el valor más alto durante las semanas que duró la experiencia, a excepción de la semana 12, donde fue mayor para el Tr2 (2000 ppm de IBA), aunque no existieron diferencias significativas entre ambos.

El Tr4 (peróxido de hidrógeno) siempre mostró valores significativamente distintos al Tr6, y a partir de la semana 10, con los tratamientos 2 y 5.

En las siguientes semanas se observó un aumento en los valores de longitud de raíces y, al final del ensayo, el Tr6 obtuvo el mayor valor (8,12 cm) seguido por los tratamientos 2 (2000 ppm de IBA), 5 (peróxido de hidrógeno + 2000 ppm de IBA), 3 (4000 ppm de IBA), no existiendo diferencias significativas entre ellos (Tabla 3).

El valor más bajo durante todo el ensayo lo exhibió el Tr1 (etanol 50%), y a partir de la semana 12 hasta la 20, mostró diferencias significativas con el resto de los tratamientos.

Tabla 3.- Efecto del tratamiento sobre la longitud de las raíces (cm) de las estacas trasplantadas.
(Separación de medias por el método de Duncan al nivel del 5% en la semana del ensayo).

Semanas	Tratamientos					
	Tr1	Tr2	Tr3	Tr4	Tr5	Tr6
6	0b	0,29b	1,06b	0b	0,37b	2,83a
8	0c	0,74bc	2,7ab	0b	1,93bc	4,78a
10	0b	6,38a	4,85a	1,61b	5,54a	6,39a
12	0c	7,44a	6,37ab	4,08b	6,9a	7,39a
14	0,68c	7,44a	6,54ab	4,43b	7,63a	7,93a
16	0,68c	7,73a	6,54ab	4,43b	7,63a	8,12a
18 - 20	0,68c	7,73a	6,54ab	4,6b	7,63a	8,12a

Tr1: etanol 50%; Tr2: 2000 ppm de IBA; Tr3: 4000 ppm de IBA; Tr4: peróxido de hidrógeno; Tr5: peróxido de hidrógeno + 2000 ppm de IBA; Tr6: peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA. Los valores, en cm, seguidos de las mismas letras dentro de la misma fila no son significativamente diferentes al nivel del 5%.

IV. 1. 2. 2. 3. Índice de enraizamiento

Los resultados obtenidos correspondientes al conjunto de tratamientos, durante la realización del ensayo, se sometieron al análisis de varianza, previa transformación del arco seno, procediendo posteriormente a la separación de medias por el método de Duncan al nivel 5%.

En la semana 6, el valor más alto (3,35) lo presentó el Tr6 (peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA), seguido de los tratamientos 3 (4000 ppm de IBA), 2 (2000 ppm de IBA), 5 (peróxido de hidrógeno + 2000 ppm de IBA) y 4 (peróxido de hidrógeno), no existiendo diferencias significativas entre ellos.

A partir de la semana 6 el valor más alto lo presentó el Tr6 (peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA), pero en la semana 14 y hasta la finalización del experimento, el valor más alto lo exhibió el Tr5 (peróxido de hidrógeno + 2000 ppm de IBA), no existiendo diferencias significativas entre ambos tratamientos.

El valor más bajo durante todo el ensayo lo mostró el Tr1 (etanol 50%), observándose diferencias significativas entre éste y el resto de los tratamientos (Tabla 4).

Tabla 4.- Efecto del tratamiento sobre el índice de enraizamiento (escala de Criley y Parvin, 1979) de las estacas de *Leucospermum* 'Spider'.

Semanas	Tratamientos					
	Tr1	Tr2	Tr3	Tr4	Tr5	Tr6
6	1,6b	3a	3,15a	2,55a	2,6a	3,35a
8	1,8c	2,85b	3,6ab	2,7b	3,3ab	4,1a
10	2b	4,45a	4,05a	3,2a	4,3a	4,5a
12	2b	4,7a	4,25a	3,6a	4,75a	4,75a
14	2c	4,65ab	4,3ab	3,65b	5a	4,7a
16	1,95b	4,7a	4,3a	3,7a	5a	4,6a
18 - 20	1,9b	4,75a	4,15a	3,8a	5a	4,65a

Tr1: etanol 50%; Tr2: 2000 ppm de IBA; Tr3: 4000 ppm de IBA; Tr4: peróxido de hidrógeno; Tr5: peróxido de hidrógeno + 2000 ppm de IBA; Tr6: peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA. Los valores seguidos de las mismas letras dentro de la misma fila no son significativamente diferentes al nivel del 5%.

Analizando el conjunto de resultados obtenidos en este ensayo, puede observarse que:

Fundamentalmente, las raíces se formaron en la base de las estacas, al igual que en el cultivar *L. 'Sucesion II'* (Rodríguez Pérez et al., 2003), y en las heridas producidas al eliminar las hojas, esto concuerda con lo observado en otros estudios de *Leucospermum 'Spider'* (Santana, 2012). Además, en todos los tratamientos se formaron raíces proteoides. Por otro lado, los cepellones mejor desarrollados fueron para los tratamientos de IBA en combinación con el peróxido de hidrógeno, mientras que con el peróxido de hidrógeno aplicado solo, se formaron pocas raíces principales pero bastantes secundarias.

El uso de peróxido de hidrógeno solo y en combinación con 2000 ppm de IBA, no produjo estacas muertas, en la propagación de *Leucospermum 'Spider'*, mientras que para el cultivar *Protea 'Pink Ice'* se observó un elevado porcentaje de estacas muertas cuando se empleó peróxido de hidrogeno solo (Vera Batista, 2016).

Las estacas tratadas solo con etanol al 50% mostraron durante todo el ensayo, los valores más bajo de estacas trasplantables, longitud de raíces e índice de enraizamiento. Al finalizar el experimento (20 semanas), se obtuvo el peor resultado con dicho tratamiento mostrando diferencias significativas con el resto (Tabla 2-3-4). Estos resultados no coinciden con los reportados por Santana (2012), que con este mismo cultivar, *Leucospermum 'Spider'*, y tratamiento logró un 100% de enraizamiento. Sin embargo, las épocas de recolección de las estacas fue distinta, octubre para Santana (2012) y febrero en el presente ensayo.

Cuando se usó IBA solo, el aumento de la concentración de 2000 ppm a 4000 ppm, no incrementó de manera significativa el porcentaje de estacas trasplantables, la longitud de las raíces y el índice de enraizamiento (Tabla 2-3), por lo que con una baja concentración (2000 ppm), en la propagación por estacas de *Leucospermum 'Spider'*, es suficiente para obtener valores aceptables coincidiendo con los resultados obtenidos por Santana (2012) para este mismo cultivar. A diferencia de esto, Worrall (1976) en la propagación por estaca de *Telopea speciosissima* obtuvo una mayor longitud radicular con mayor concentración de IBA.

Cuando se empleó el peróxido de hidrógeno solo, los porcentajes de estacas trasplantables y longitud de raíces fueron significativamente más bajos que cuando se empleó 2000 ppm de IBA o la combinación de peróxido de hidrógeno + 2000 ppm de IBA. Sin embargo, la aplicación de peróxido de hidrógeno dio el mayor porcentaje de estacas trasplantables, la mayor longitud de raíces y el mayor índice de enraizamiento para el cultivar *Protea 'Pink Ice'* (Vera Batista, 2016). Sin embargo, para *Leucospermum 'Spider'* el uso de peróxido de hidrógeno solo, no mostró

diferencias significativas en cuanto al índice de enraizamiento con el resto de tratamiento, excepto con el etanol al 50% que mostró valores muy bajos (Tabla 4).

La combinación IBA + peróxido de hidrógeno produjo estacas trasplantables en *L. 'Spider'*, mientras que no las produjo para el cultivar *Protea 'Pink Ice'* (Vera Batista, 2016). Esta combinación no aumentó significativamente los porcentajes de estacas trasplantables, calidad del enraizamiento (longitud de las raíces) e índice de enraizamiento, con respecto al uso de IBA sola (Tabla 3-4), a diferencia de Sebastiani y Tongnetti (2004) que aplicaron 4000 ppm de IBA + peróxido de hidrógeno para estacas de olivo de *Olea 'Frantoio'* y *O. 'Gentile di Larino'*, dando valores de enraizamiento más elevados que cuando se utilizó IBA solo. Sin embargo, la combinación de IBA + peróxido de hidrógeno reduce el tiempo de enraizamiento. Por otro lado, la combinación de diferentes concentraciones de IBA + peróxido de hidrógeno no mostró diferencias significativas al final del experimento.

IV. 2. ENSAYO II: Estudio histológico de las estacas de *Leucospermum* ‘Spider’

IV. 2. 1. Materiales y métodos

Las plantas de *Leucospermum* ‘Spider’ seleccionadas para el estudio a microscopía, fueron tanto brotes jóvenes como maduros, de 7 plantas diferentes de 5 años de edad. De estas muestras prototipos se eligieron tallos y hojas para la obtención de muestras histológicas.

La recogida de las muestras prototipo se realizó en las parcelas dedicadas al cultivo de proteas localizadas en la Sección de Ingeniería Agraria de la Escuela Politécnica Superior de Ingeniería situada en San Cristóbal de La Laguna.

Así mismo, de las estacas sometidas a los diferentes tratamientos (Tr 1-Tr 6), después de 14 semanas a partir del inicio de los mismos, se obtuvieron muestras para la observación al microscopio óptico (MO).

Tabla 5.- Tratamientos empleados en la propagación por estacas de *Leucospermum* ‘Spider’.

Tratamientos	Producto
Tr1	etanol 50%
Tr2	2000 ppm de IBA
Tr3	4000 ppm de IBA
Tr4	peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) al (3,5%)
Tr5	H ₂ O ₂ + 2000 ppm de IBA
Tr6	H ₂ O ₂ + 4000 ppm de IBA

Las estacas con callos, o callos y raíces, de *Leucospermum* ‘Spider’ sometidas a los tratamientos 2, 5 y 6, se extrajeron del sustrato de propagación, para el estudio histológico, y se lavaron con agua destilada para eliminar los restos del sustrato que pudieran quedar adheridos. Se cortó la base de las estacas, con callos o callos y raíces, eliminando el resto de la estaca y se colocaron en placas de Petri.

En éstas zonas basales se realizaron cortes transversales, de 4-5 mm de grosor, con ayuda de un bisturí, y se mantuvieron con una ligera capa de agua destilada para evitar la deshidratación. Se observaron con una Lupa Leica MZ 95 y se realizaron dibujos y fotografías de las mismas.

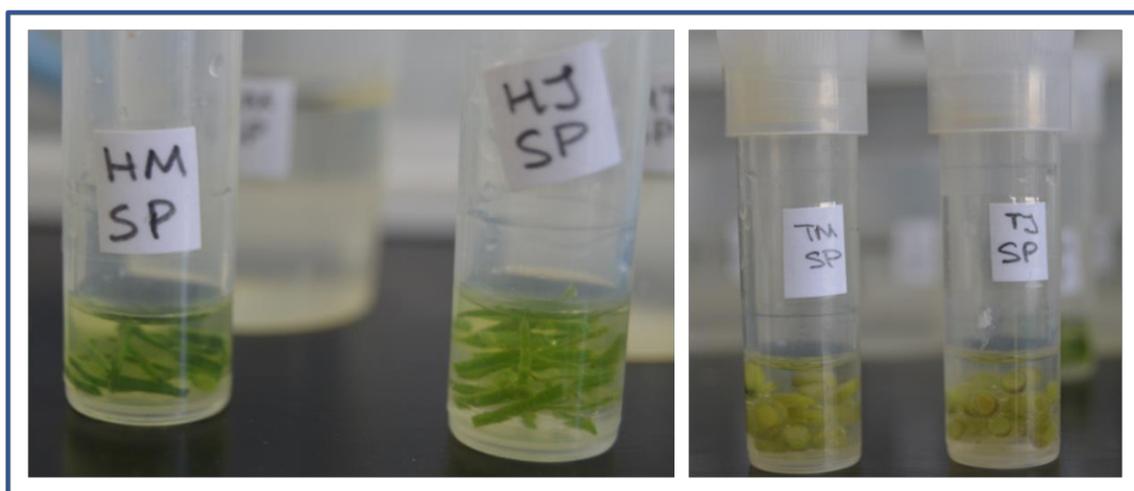
Cuando las estacas presentaban raíces con una longitud excesiva se cortaban para minimizar el tamaño de las muestras.

IV. 2. 1. 2. Preparación de muestras para inclusión en paraplast plus

Los tallos y las hojas (prototipo), en las zonas medias, se seccionaron transversalmente (4-5 réplicas) con un bisturí, obteniendo cortes de unos 3 mm de grosor.



Fotografía 13.- Corte de muestras.



Fotografía 14.- Cortes transversales de tallos y hojas jóvenes y maduros.

IV. 2. 1. 2. 1. Técnicas generales de fijación, inclusión y tinción de las muestras prototipo

Fijación

Una vez seleccionadas las muestras prototipo (tallos y hojas jóvenes y maduros), se fijaron en FAA durante 48 horas (2 baños con el mismo fijador, cada uno de 24 h).

Esta misma técnica se empleó para las estacas que provenían de los diferentes tratamientos, mencionados anteriormente.

Inclusión en paraplast

Una vez fijadas las piezas de hojas y tallos, fue necesaria la realización de las siguientes etapas:

- Deshidratación

El material se deshidrata para eliminar el agua existente en los tejidos, mediante baños en alcohol etílico de graduación creciente terminando en etanol 100%. Siendo el tiempo de cada baño de:

Producto	Tiempo
Etanol 70%	2 horas
Etanol 90%	5 horas
Etanol 100%	2 x 24 hora

- Impregnación con solvente del paraplast: diafanización

Consiste en sustituir el etanol de deshidratación por un solvente del paraplast. El solvente que se ha utilizado es el tolueno, realizando baños de etanol 100% y tolueno en proporciones variables, siendo el tiempo de cada baño de:

Producto	Tiempo
Etanol 100%-Tolueno (2:1)	20 minutos
Etanol 100%-Tolueno (1:1)	15 minutos
Etanol 100%-Tolueno (1:2)	15 minutos

- Inclusión en paraplast plus

La penetración e impregnación del paraplast no es perfecta si no se elimina por completo el disolvente intermedio. La impregnación se hace mediante diluciones y pases sucesivos por cápsulas de porcelana que contiene paraplast cada vez más puro.

En primer lugar se pasaron las muestras por un baño de Tolueno-Paraplast y posteriormente se realizaron tres baños sucesivos en paraplast puro, en el interior de la estufa (60°C):

Producto	Tiempo
Tolueno-Paraplast (1:1)	20 - 30 minutos
Paraplast I	1 hora
Paraplast II	2 horas
Paraplast III	24 horas

- Realización de bloques de paraplast

Los bloques de paraplast se realizaron usando las piezas de Leuckart, en ellas se vertió el paraplast fundido y se colocaron las muestras centradas y orientadas, esperando a temperatura ambiente hasta que solidificó el paraplast, para posteriormente realizar los cortes.



Fotografía 15.- Piezas de Leuckart.

Microtomía

Los cortes se realizaron con un micrótopo Reichert-jung Mod. 1130/Biocut. Se obtuvieron secciones transversales de 10 μm , aunque en algunos casos se cortaron a 14-20 μm . Las cuales se colocaban en portaobjetos con unas gotas de medio albuminado sobre una placa calefactora (38-40°C), consiguiendo que los cortes quedaran perfectamente estirados y adheridos a los mismos. A continuación los portaobjetos se introdujeron en una estufa a 35- 40°C durante 24-48 horas.



Fotografía 16.- Micrótopo Reichert-jung Mod. 1130/Biocut.



Fotografía 17.- Portaobjetos sobre la placa calefactora.

Tinción

- Desparafinado e Hidratación

Los portaobjetos con las secciones de las muestras se colocaron en una cesta de vidrio y se introdujeron en cubetas donde se realizaron baños sucesivos con xileno y posterior hidratación con etanol de graduación decreciente para finalizar con agua destilada:

Producto	Tiempo
Xileno I	30 minutos
Xileno II	30 minutos
Xileno III	30 minutos
Etanol 100%	30 minutos
Etanol 96%	1 hora
Etanol 70%	1 hora
Agua destilada	1 hora

- Tinción Safranina/Verde rápido o “Tinción Doble” de Johansen (1940)

La safranina (básico) es el colorante más importante empleado en técnicas vegetales, morfológicas y citología. Es capaz de teñir estructuras lignificadas, cutinizadas, suberificadas y también, cromosomas, núcleos y centrosomas. La safranina aparece de color rojo brillante en las estructuras citadas.

El verde rápido, o fast green (ácido), se usa como diferenciador, tiñendo paredes celulares con celulosa y citoplasma. El fast green aparece de color verde brillante en las estructuras citadas.

“Tinción Safranina/Verde rápido” (modificada de Johansen, 1940):

- Una vez las secciones desparafinadas e hidratadas se introdujeron en unas cubetas con una solución de safranina por un tiempo de 2 horas.
- Se lavó el exceso de colorante con agua corriente durante 20 minutos, diferenciándose y deshidratándose con etanol 96 durante unos minutos,
- Se completó la deshidratación en etanol 100% con dos baños de 15 minutos cada uno.
- Para contrastar las secciones se usó verde rápido durante 25 segundos.
- Posteriormente se aclaró con una solución de aceite de clavo, etanol absoluto, xileno (2:1:1), durante unos minutos.

- A continuación se lavó el agente aclarante con xileno (añadir 3-4 gotas de etanol absoluto para eliminar cualquier hidratación accidental).
- Finalmente, las secciones se pasaron dos veces (2 x 10 minutos) por xileno puro y montadas con Eukitt (Kinder, Germany).

Fotomicrografías

Las fotomicrografías fueron obtenidas en un microscopio óptico Leica Mod. DM4000, con un sistema de captura de imagen por ordenador Leica QWin V3. Las imágenes se digitalizaron sólo haciendo adaptaciones de contraste, las figuras no fueron manipuladas.

IV. 2. 1. 3. Preparación de muestras para inclusión en resina Spurr (1969)

Secciones de 3 mm de las zonas medias de tallos y hojas (prototipo) se utilizaron para la inclusión en resina Spurr. Además, las partes basales de las estacas, con callo o callo y raíces, se trocearon en porciones más pequeñas para su fijación e inclusión en resina Spurr (1969). Estas secciones de muestra se dibujaron a mano y se fotografiaron con una Lupa Leica MZ 95 con un sistema de captura de imagen por ordenador Leica IM50 Image Manager.

Las diferentes muestras se seccionaron a mano alzada, transversalmente y se sumergieron en agua destilada durante 24 horas para una buena hidratación.

IV. 2. 1. 3. 1. Técnicas generales de fijación, inclusión en resina y tinción

Fijación

Para la inclusión fue necesaria la realización de las siguientes etapas (Tabla 5):

- Deshidratación en series creciente de etanol.
- Diafanización en acetona, tres baños de diferente concentración.
- Inclusión en resina Spurr (1969), en series crecientes de proporciones de resina.
- Polimerización de la resina en moldes de silicona.

Tabla 6.- Protocolo de inclusión en resina Spurr

Producto	Tiempo
Etanol 30%	10 minutos
Etanol 50%	10 minutos
Etanol 70%	10 minutos
Etanol 90%	10 minutos
Etanol 100%	2 x 10 minutos
Etanol 100%-Acetona (1:1)	10 minutos
Acetona	10 minutos
Acetona- Resina (2:1)	30 minutos
Acetona- Resina (1:1)	1 hora
Resina	12-24 horas
Polimerización Bloques	24-48 horas a 60°C

Microtomía

Las secciones transversales semifinas (0,5 μm) se obtuvieron con un ultramicrotomo Reichter Ultracut-S Leica equipado con cuchillas de vidrio. Los cortes semifinos se colocaron en portaobjetos.

Tinción

Las secciones semifinas se tiñeron con azul de toluidina-borax para su observación a microscopía óptica.

Fotomicrografías

Las fotomicrografías de los semifinos se realizaron en un microscopio óptico Leica Mod. DM4000B, con un sistema de captura de imagen por ordenador Leica QWin V3.

Todas las imágenes se digitalizaron sólo haciendo adaptaciones de contraste, las figuras no fueron manipuladas.

IV. 2. 1. 4. Preparación de epidermis de hojas para microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se realizaron preparaciones de secciones paradermales de epidermis foliares (joven y madura) adaxiales y abaxiales para el estudio a MO. Estas secciones se obtuvieron por desgarro de la epidermis con ayuda de un bisturí y unas pinzas. Las secciones se montaron en agua, colocando

un cubreobjetos, el cual se selló con laca de uñas, y se observaron directamente, antes de que el medio acuoso se secase.

Para MEB, las secciones de epidermis de aproximadamente 12 mm² (3*4) de las muestras de hojas (jóvenes y maduras) se hidrataron en agua durante 24 horas antes de comenzar el proceso de fijación, el cual se realizó con glutaraldehído 2,5% en PB 0,05 M. Una vez fijado, el material se deshidrató en etanol de graduación creciente. La desecación tuvo lugar con 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (HMDS), (Tabla 6).

Las secciones epidérmicas se montaron sobre pedestales metálicos provistos con discos de carbono con doble capa adhesiva, se sombrearon en un sombreador Bal.tec SCD 005 durante 140 segundos, con 0,015 µm de plata y se observaron y fotografiaron con un MEB-JEOL JSM 6300 (Servicio de Microscopía Electrónica del Servicio General de Apoyo a la Investigación (SEGAI) de la Universidad de La Laguna).

Tabla 7.- Protocolo de preparación de las muestras para el estudio al MEB

Procedimiento	Producto	Tiempo
FIJACIÓN	Glutaraldehído	2 horas
LAVADO	PB 0,1 M	2 x 1 hora
DESHIDRATACIÓN	Etanol 50%	10 minutos
	Etanol 70%	10 minutos
	Etanol 80%	10 minutos
	Etanol 90%	10 minutos
	Etanol 100%	10 minutos
DESECACIÓN	Etanol 100%/HMDS (2:1)	15 minutos
	Etanol 1000%/HMDS (1:2)	15 minutos
	HMDS	2 x 15 minutos
MONTAJE		
SECADO AL AIRE	-	12 horas

IV. 2. 1. 5. Preparación de los reactivos

A. Fijadores y tampón

- FAA

Producto	Cantidad
Etanol 100%	90 ml
Ácido acético	5 ml
Formaldehido	5 ml

- Glutaraldehido 3%

Producto	Cantidad
Glutaraldehido 25%	12 ml
PB 0.1 M	88 ml

- Tampón fosfato

Producto	Cantidad
Solución A: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	En 100 ml de H_2O
Solución B: Na_2HPO_4	En 100 ml de H_2O
Agua destilada según concentración	100 ml de H_2O

B. Colorantes

- Safranina

Producto	Cantidad
Safranina	1 g
Metil-cellosolve	50 ml
Etanol 96%	25 ml
Acetato sódico	1 g
Formaldehído	2 ml
Agua	25 ml

- Verde rápido

Producto	Cantidad
Verde rápido	0,5 g
Metil-cellosolve	6 ml
Aceite de clavo	6 ml

Etanol 96%	35 ml
Alcohol butílico terciario	35 ml
Ácido acético al 1%	12 ml

Se prepara una solución saturada de Verde rápido en la mezcla de metil-cellosolve y aceite de clavo, a continuación se le añade el resto de los productos. Se disuelve primero el colorante en el metil-cellosolve y se añade posteriormente el alcohol. Aparte se disuelve el acetato sódico en el formaldehído y esta mezcla se añade a la solución colorante.

- Azul de toluidina – bórax

Producto	Cantidad
Azul de toluidina	1%
Borax	1%

C. Medios de montaje

- Medio Albuminado

Producto	Cantidad
Albúmina seca	1 g
Glicerina	8 ml
Salicilato de sodio	0,5 g
Agua destilada	10 ml

Se mezcla la albúmina, glicerina y salicilato de sodio en un mortero hasta obtener una pasta homogénea, posteriormente se le añade el agua destilada.

D. Resinas

- Resina Spurr

Producto	Cantidad
N.S.A. (Nonenyl Succinic Anhydride)	26 g
V.C.D. (Vinylcyclohexene dioxide)	10 g
D.E.R. 736	7 g
D.M.A.E. (N,N Dimethylethanolamine)	0.4 g

IV. 2. 2. Resultados y discusión

IV. 2. 2. 1. Características estructurales de las muestras prototipo de *Leucospermum* ‘Spider’

En este apartado se describió la anatomía de las hojas y tallos prototipo de *Leucospermum* ‘Spider’.

Hoja joven

La sección transversal (s.t.) de la hoja joven mostró epidermis simple, formada por células de distinto tamaño y paredes tangenciales externas, engrosadas en ambas superficies foliares, protegidas por una cutícula lisa y delgada (Fig. 1.1). Numerosos tricomas simples y alargados, con la base ensanchada y ornamentación granular y granular-estriada (Fig. 1.4). Hoja anfiestomática, con estomas reniformes, superficiales paracíticos en superficie adaxial y abaxial (Fig. 1.3).

La s.t., de simetría dorsiventral, con parénquima en empalizada, 1-2 capas, en el haz y en el envés (Fig. 1.5). Células alargadas, con vacuolas con sustancias tipo taninos (Fig. 1.2) y con algunos espacios intercelulares. Parénquima esponjoso de células grandes e irregulares, paredes de menor grosor que el parénquima en empalizada. En los bordes del limbo colénquima angular (Figs. 1.1-1.2).

Haces vasculares central y secundarios bien visibles, de organización colateral, con floema abaxial; xilema más abundante que el floema, formado por fibras de diferentes tamaños con paredes engrosadas. Elementos del floema de paredes delgadas. Vaina del haz sin cloroplastos. Esclerenquima, prácticamente inexistentes, no se diferenciaron las fibras que lo componían (Fig. 1.5).

Figura 1.- Hoja joven.

Fig. 1.1: Visión panorámica de la hoja joven en la que se observaron epidermis, colénquima angular y haces vasculares.

Fig. 1.2: Obsérvese la distribución de los haces vasculares y mesófilo con taninos.

Fig. 1.3: Epidermis adaxial donde se mostró los estomas y la base de los tricomas.

Fig. 1.4: Ornamentación del tricoma.

Fig. 1.5: Nótese el parénquima empalizada, vaina del haz y haz vascular.

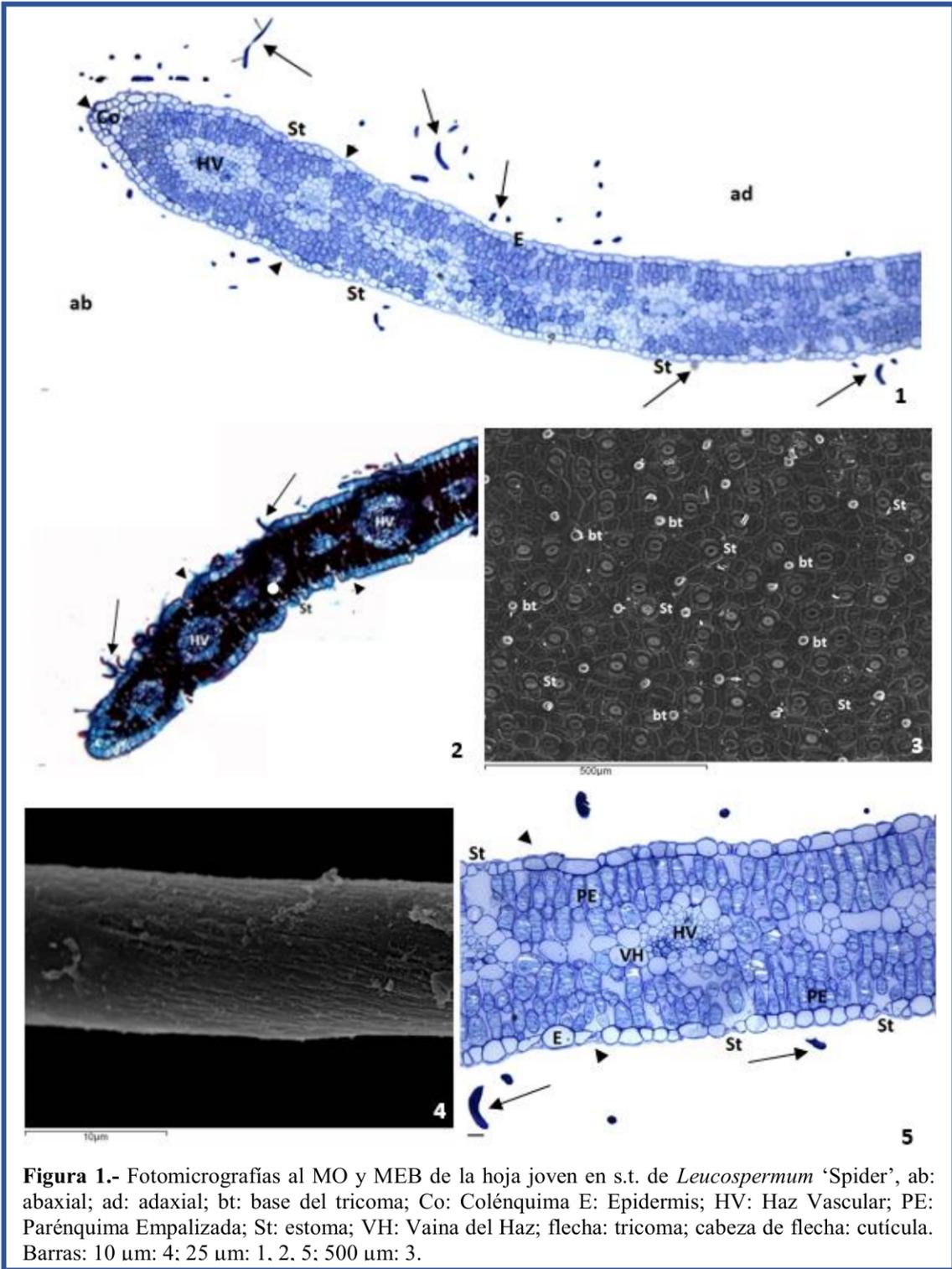


Figura 1.- Fotomicrografías al MO y MEB de la hoja joven en s.t. de *Leucospermum* 'Spider', ab: abaxial; ad: adaxial; bt: base del tricoma; Co: Colénquima E: Epidermis; HV: Haz Vascular; PE: Parénquima Empalizada; St: estoma; VH: Vaina del Haz; flecha: tricoma; cabeza de flecha: cutícula. Barras: 10 µm: 4; 25 µm: 1, 2, 5; 500 µm: 3.

Hoja madura

La s.t. de la hoja madura mostró epidermis simple, formada por células de distinto tamaño y paredes tangenciales externas, engrosadas en ambas superficies. Cutícula lisa y más gruesa que en los ejemplares jóvenes (Fig. 2.1). Tricomas simples y alargados en ambas superficies, de igual tipología que en las hojas jóvenes pero con ornamentación estriada (Figs. 2.2-3.2). Hoja anfiestomática, con estomas reniformes, superficiales, paracíticos, abiertos y cerrados; células oclusivas con marcado borde cuticular (Fig. 3.3).

La s.t., de simetría dorsiventral, con 2-3 capas de parénquima en empalizada en el haz y en el envés, con espacios intercelulares relativamente pequeños. Parénquima esponjoso en posición interna en la s.t. Células parenquimáticas con taninos en su interior (Fig. 2.1). Las secciones semifinas mostraron disposición de los cloroplastos en torno al tonoplasto y en las proximidades de la pared celular (Fig. 3.4). Colénquima subepidérmico en los márgenes del limbo foliar, formado por 2-3 capas de células de paredes engrosadas en los ángulos. Las fibras del esclerénquima perivascular fueron poligonales con los extremos aguzados y paredes engrosadas, que casi llegaron a obliterar el lumen celular (Fig. 3.4).

Haces vasculares centrales y secundarios bien visibles, de organización colateral, floema abaxial (Fig. 3.4); xilema abundante, formado por fibras de diferentes tamaños con paredes engrosadas. Cambium vascular formado por 2-3 capas de células de pequeño tamaño. Vaina del haz sin cloroplastos.

Figura 2.- Hoja madura.

Figura 2.1: Visión panorámica de la hoja madura, en la que se observaron la epidermis, mesófilo con taninos, haces vasculares primarios y secundarios.

Figura 2.2: Sección paradermal de la epidermis abaxial con tricomas y estomas.

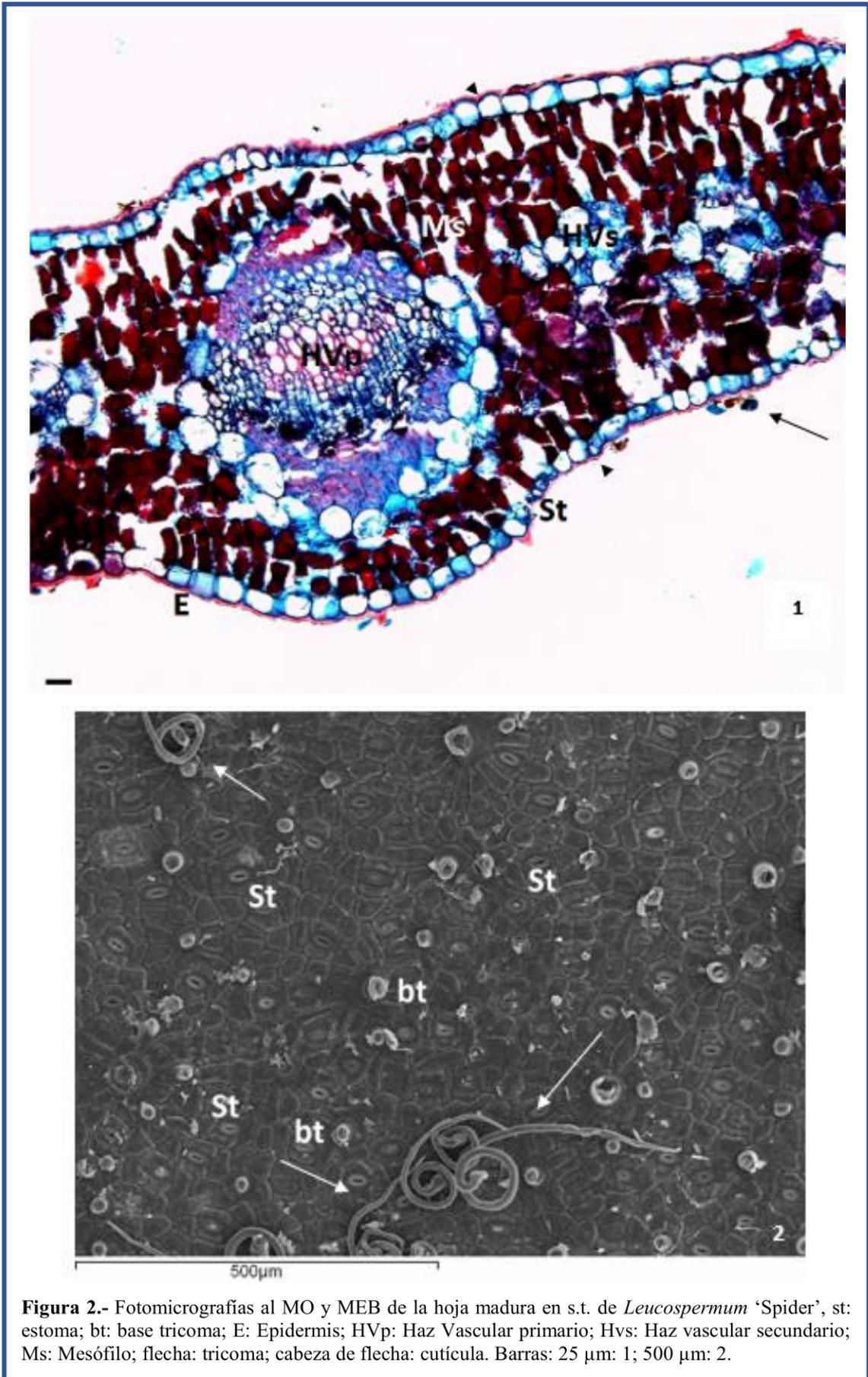


Figura 2.- Fotomicrografías al MO y MEB de la hoja madura en s.t. de *Leucospermum* 'Spider', st: estoma; bt: base tricoma; E: Epidermis; Hvp: Haz Vascular primario; Hvs: Haz vascular secundario; Ms: Mesófilo; flecha: tricoma; cabeza de flecha: cutícula. Barras: 25 μm: 1; 500 μm: 2.

Figura 3-. Hoja madura.

Figura 3.1: Epidermis adaxial y base de un tricoma.

Figura 3.2: Ornamentación del tricoma.

Figura 3.3: Estoma paracítico y células anexas.

Figura 3.4: Detalle de un haz vascular. Obsérvese el xilema, cambium vascular, floema y esclerénquima perivascular. Además células parenquimáticas con cloroplastos próximos a la pared células.

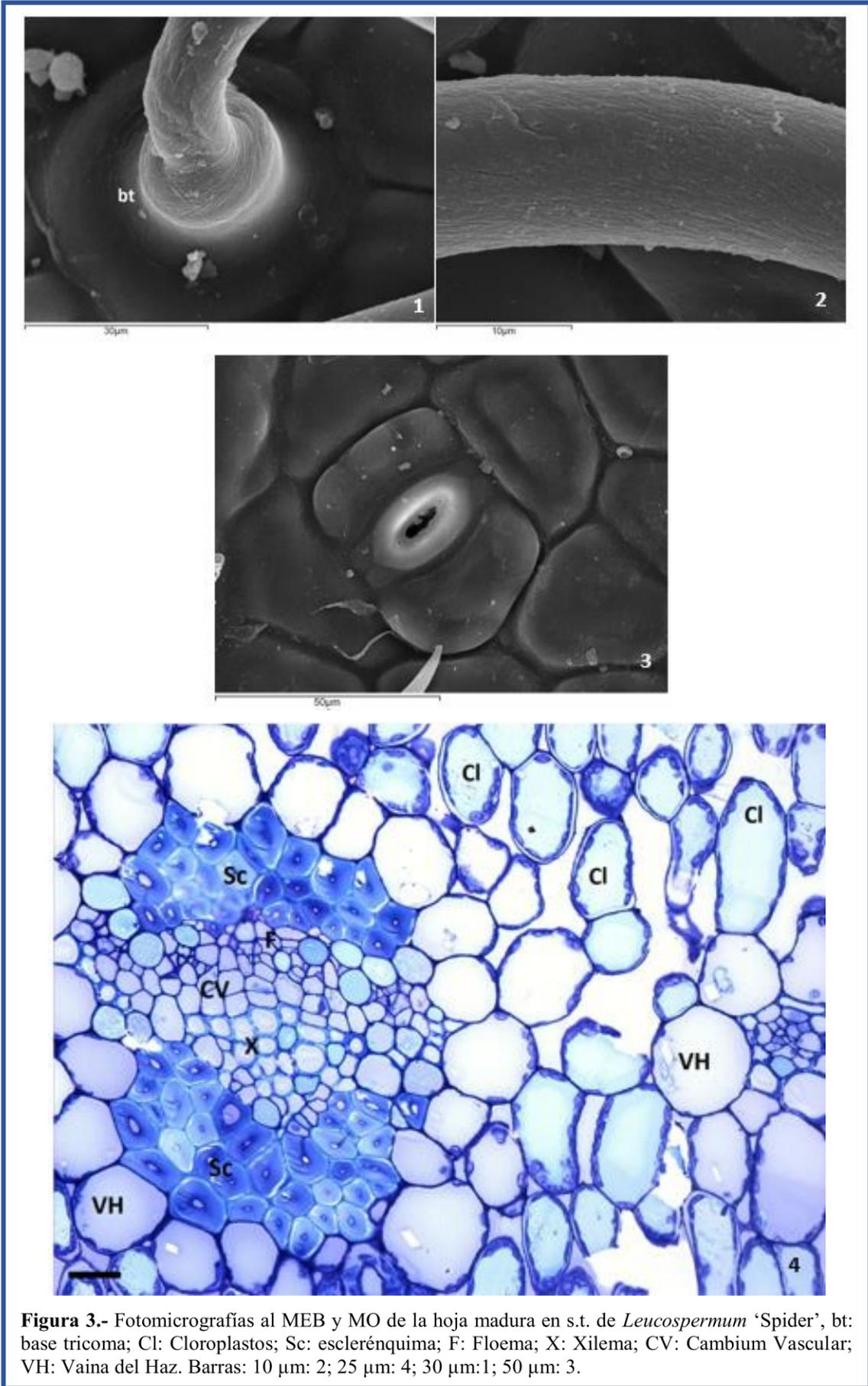


Figura 3.- Fotomicrografías al MEB y MO de la hoja madura en s.t. de *Leucospermum* 'Spider', bt: base tricoma; Cl: Cloroplastos; Sc: esclerénquima; F: Floema; X: Xilema; CV: Cambium Vascular; VH: Vaina del Haz. Barras: 10 µm: 2; 25 µm: 4; 30 µm:1; 50 µm: 3.

Discusión de las características estructurales de las hojas de las muestras prototipo

Las hojas, en s.t., de las plantas estudiadas (ejemplares jóvenes y maduros) en este Trabajo de Fin de Grado, mostraron simetría dorsiventral y presentaron epidermis, mesófilo y haces vasculares colaterales, cuyo desarrollo, grosor y grado de esclerofilia varía cuando se comparan los ejemplares jóvenes y maduros.

Los resultados expuestos en este documento señalaron que en el cultivar *Leucospermum* ‘Spider’, la epidermis foliar simple, estuvo formada por células de diversos tamaños y paredes tangenciales externas engrosadas en ambas superficies, protegidas por una cutícula lisa y delgada, al igual que *L. patersonii* y *L. ‘Sucesion I’* pero de menor grosor que en las plantas del género *Protea*, como fue el caso de *P. obtusifolia*, que mostró una epidermis de mayor grosor (Vera Batista, 2016). No se apreciaron diferencias entre la epidermis del haz y el envés ni variaciones en el grosor de la epidermis para ejemplares jóvenes y maduros de *Leucospermum* ‘Spider’, en cambio Teixeira et al. (2008) manifestaron que si ocurrían en las hojas del género *Hakea*, concretamente en *H. salicifolia* y *H. sericea*.

Por otro lado, el grosor de la cutícula mostró mayor grosor en los ejemplares maduros con respecto a los jóvenes. Este mayor grosor podría suponer un obstáculo efectivo para la difusión del agua según Alvin (1982) y Rocas et al. (1997). En cambio Becker et al. (1986) y posteriormente Schreiber y Kerstiens (2006), su grosor no siempre tiene que implicar mayor eficacia como restricción para el transporte de agua, siendo las delgadas a menudo más resistentes a la difusión.

En ambas muestras, jóvenes y maduras, se observaron cantidades variables de fenoles en sus vacuolas. Según Fahn y Cutler (1992) la presencia de taninos en las células epidérmicas de la hoja se ha considerado como un valor adaptativo en condiciones xeromórficas, sin embargo, no parece ser el caso de estas plantas objeto de estudio, obtenidas de la Sección de Ingeniería Agraria de la Escuela Politécnica Superior de Ingeniería (EPSI), ubicada en San Cristóbal de La Laguna, cuya clasificación del clima es Csb (Océánico mediterráneo) en la clasificación de Köppen (1900), donde el agua no ha sido un factor limitante. Otros autores como Mole et al. (1988) asociaron la existencia de taninos y fenoles con altos niveles de intensidad lumínica. La acumulación de depósitos fenólicos podrían absorber radiaciones UV – B y la mayoría de esa radiación consumirse antes de llegar a los tejidos internos como indicaron León et al. (2014) para *P. ‘Susara’*. Según Day et al. (1993) al estar la cutícula y la epidermis en las primeras capas de la hoja, el cribado de UV-B podría reducir la penetración a tejidos más sensibles del mesófilo del interior de las hojas. En las hojas, jóvenes y maduras, de *L. ‘Spider’* se observaron grandes cantidades de estas sustancias tipo taninos en el interior.

Los tricomas, en las hojas jóvenes y maduras, aquí estudiadas, fueron simples y alargados y los podemos encontrar tanto en la superficie adaxial como abaxial, más abundantes en las hojas maduras y de ornamentación estriada con respecto a los ejemplares jóvenes. Según Levin (1973) los tricomas se mostraron como un mecanismo de defensa para la planta, especialmente con respecto a los insectos fitófagos, sin embargo, según Malan (1988) este hecho parecía poco probable ya que a las proteas les perjudican plagas de este tipo de insectos.

Los estomas se localizaron tanto en la parte abaxial como en la adaxial, siendo la hoja anfiestomática. Datos que coinciden con lo expuesto por Groom et al. (1994) para *Hakea trifurcata*, Rossatto et al. (2015) para *Roupala montana*, y Vera Batista (2016) para *P. obtusifolia*, *P. 'Pink Ice'*, *P. 'Susara'*, *L. patersonii* y *L. 'Sucesion I'*. Sin embargo, no se podría afirmar que todas las proteas cumplan con estas características, así Brodribb et al. (2013) realizaron un ensayo de la distribución estomática en diferentes plantas de la familia Proteaceae y dedujeron que la mayor parte de las ensayadas era hipoestomáticas, coincidiendo con lo citado por Fujino (1984) para plantas del género *Banksia* y *Telopea*.

Los estomas se presentaron como estructuras muy eficientes a nivel fotosintético, empleo del agua y abastecimiento hidráulico (Mott et al., 1982). Según Parkhurst (1978) la situación de los estomas en ambas superficies foliares era un rasgo xeromórfico y una respuesta al incremento de aridez. Sin embargo, en los ejemplares estudiados no parece que no se deba a un aumento del estrés hídrico sino más bien a condiciones de altos niveles lumínicos, ya que todas las plantas crecen en ambientes abiertos, al igual que citó Vera Batista (2016) para especies y cultivares de *Leucospermum* y *Protea*.

En cuanto a la organización histológica el tejido fundamental manifestó una simetría dorsiventral, en jóvenes y maduras. Parénquima en empalizada, con abundantes sustancias fenólicas y algunos espacios intercelulares, al igual que en *P. 'Pink Ice'* (Vera Batista, 2016).

Los haces vasculares de las hojas jóvenes, de *Leucospermum 'Spider'*, se mostraron menos desarrollados que los de las hojas maduras, aunque no presentaron gran variabilidad morfológica. En ambas hojas fueron colaterales, rodeados por vainas del haz. El esclerénquima de la hoja madura estaba desarrollado, en el que se diferenciaron las fibras que lo componen mientras que en la hoja joven fueron prácticamente inexistente. Se observaron diferencias de tamaño entre el haz principal y los secundarios, coincidiendo con lo expresado por Vera Batista (2016) para plantas del mismo género como *L. patersonii* y *L. 'Sucesion I'*.

Tallo joven

La s.t. del tallo fue circular con ordenación tisular concéntrica (Fig. 4.1). Epidermis simple con cutícula lisa y gruesa que se adaptó a la forma celular; numerosos tricomas con célula basal a modo de base, y célula superior alargada (Figs. 4.1-4.2).

Colénquima subepidérmico formado por 6-8 capas de células y de distribución no uniforme en todo el perímetro del tallo, con algunos espacios intercelulares. Las células colenquimáticas presentaron paredes engrosadas en los ángulos (Fig. 4.2).

El córtex parenquimático mostró un número variable de capas (9-10) celulares y escasos espacios intercelulares (Fig. 4.4); células con gran contenido de compuestos fenólicos (Fig. 4.1-4.4). En este córtex se pudieron observar pequeños grupos de haces vasculares (Fig. 4.4). Escasa presencia de las fibras que forman el esclerénquima, de paredes poco engrosadas. Sin embargo, se observaron células pétreas, tanto individuales como agrupadas en número de 2-3, con paredes muy engrosadas y desprovistas de contenido celular (Fig. 4.3).

Haces vasculares en fascículos, con escaso desarrollo y separados por 1-2 filas de parénquima interfascicular; floema centrifugo al cambium formado por células irregulares y de pequeño tamaño; cambium vascular formado por 4-6 capas de células alargadas; xilema centrípeto al cambium, vasos xilemáticos de diferentes tamaños y paredes engrosadas (Fig. 4.4).

Médula central amplia, cuyas células fueron de gran tamaño y alto contenido en compuestos fenólicos, con escasos espacios intercelulares (Fig. 4.1).

Figura 4.- Tallo joven

Fig. 4.1: Panorámica que mostró la disposición concéntrica de los tejidos: epidermis, córtex, haces vasculares y médula.

Fig. 4.2: Epidermis con cutícula lisa, colénquima angular y tricomas.

Fig. 4.3: Detalle de células pétreas corticales.

Fig. 4.4: Córtex parenquimático y haces vasculares colaterales con parénquima interfascicular y médula central con compuestos fenólicos.

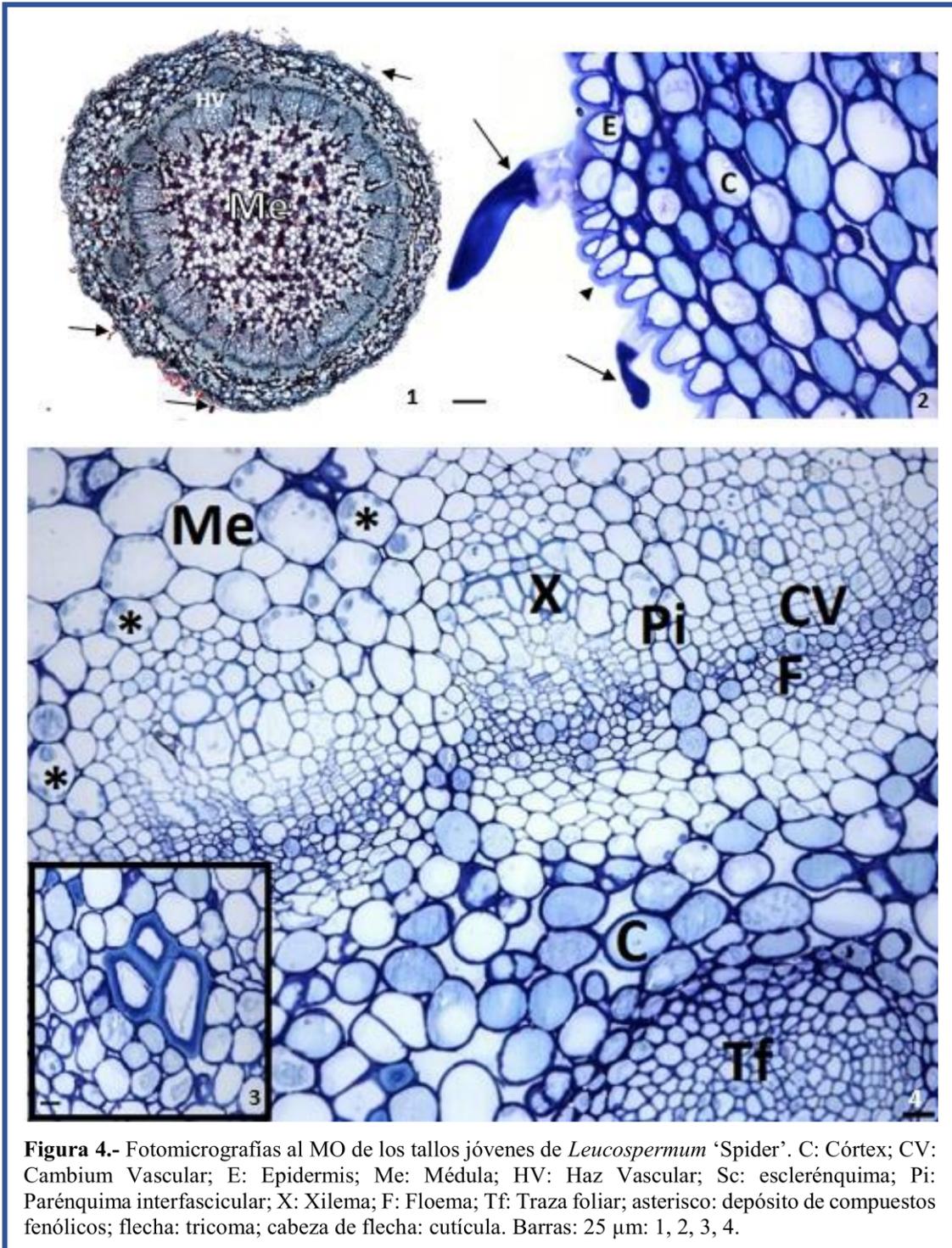


Figura 4.- Fotomicrografías al MO de los tallos jóvenes de *Leucospermum* 'Spider'. C: Córtex; CV: Cambium Vascular; E: Epidermis; Me: Médula; HV: Haz Vascular; Sc: esclerénquima; Pi: Parénquima interfascicular; X: Xilema; F: Floema; Tf: Traza foliar; asterisco: depósito de compuestos fenólicos; flecha: tricoma; cabeza de flecha: cutícula. Barras: 25 µm: 1, 2, 3, 4.

Tallo maduro

La s.t. del tallo mostró una disposición tisular concéntrica. Epidermis simple de células papilosas y protegidas por una cutícula lisa y gruesa. Ausencia de depósitos fenólicos en el lumen celular epidemial. Abundantes tricomas simples, con célula basal y célula superior alargada que se desprende durante las técnicas de MO (Figs. 5.1-5.2).

Colénquima angular subepidérmico formado por 2-3 capas de células y de distribución no uniforme en todo el perímetro del tallo, presentó escasos espacios intercelulares. Córtex parenquimático en el que se distinguieron células pétreas individuales o agrupadas en número de 2-3, con paredes muy engrosadas y desprovistas de contenido celular. Esclerénquima perivascular de paredes engrosadas y escasa luz celular (Fig. 5.3).

Los haces vasculares colaterales, con crecimiento secundario, rodearon una extensa médula parenquimática. Vasos de varios tamaños se dispusieron desordenadamente entre el tejido xilemático; floema, de tubos cribosos y fibras, centrífugo al cambium vascular y xilema centrípeto al cambium (Fig. 5.3). Cambium vascular constituido por 7-8 capas de células aplanadas. Parénquima interfascicular de 1-3 filas de células.

La médula central presentó células redondeadas con escasos espacios intercelulares y escasos depósitos de fenoles en el lumen celular (Fig. 5.1).

Figura 5.- Tallo maduro

Fig. 5.1: Panorámica que mostró la disposición de la epidermis, colénquima, haces vasculares y médula.

Fig. 5.2: Epidermis con cutícula lisa, tricomas y colénquima angular.

Fig. 5.3: Córtex parenquimático con depósitos fenólicos y haces vasculares colaterales bien desarrollados.

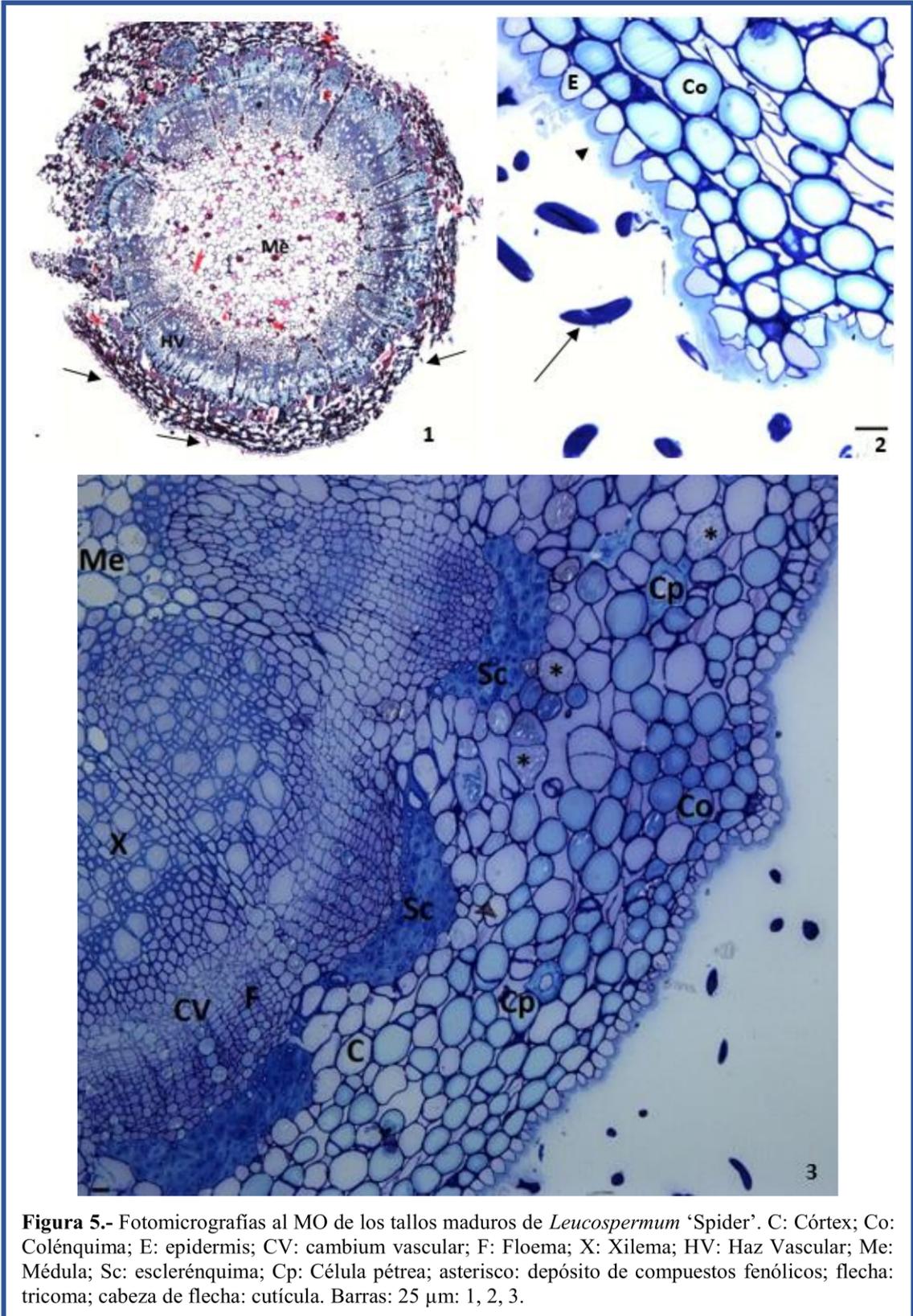


Figura 5.- Fotomicrografías al MO de los tallos maduros de *Leucospermum* 'Spider'. C: Córtex; Co: Colénquima; E: epidermis; CV: cambium vascular; F: Floema; X: Xilema; HV: Haz Vascular; Me: Médula; Sc: esclerénquima; Cp: Célula pétreas; asterisco: depósito de compuestos fenólicos; flecha: tricoma; cabeza de flecha: cutícula. Barras: 25 μ m: 1, 2, 3.

Discusión de las características estructurales de los tallos prototipo

Los tallos, jóvenes y maduros, de *Leucospermum* 'Spider' fueron circulares con ordenación tisular concéntrica, cuya epidermis fue simple, y cutícula lisa y gruesa. Ausencia de depósitos fenólicos en el lumen celular epidermial.

Según Pérez Francés et al. (2001), las características de la epidermis y cutícula se han citado para plantas de otros género como *Leucadendron*, *L. discolor* y *L. 'Safari Sunset'*, predominando las cutículas extensas. También comparten estas características *P. 'Susara'* y *P. 'Pink Ice'* (Vera Batista, 2016).

Los tricomas observados en el tallo fueron simples, con célula basal y superior alargada. Según Ehleringer et al. (1976) y Fahn (1985) su presencia se relaciona con la prevención en la pérdida de agua y como barrera frente a la radiación.

En los tallos jóvenes se observó colénquima subepidémico formado por 6-8 capas de células, mientras que en los maduros, por 2-3 capas. Este tejido colenquimático se manifiesta en estructuras en vías de crecimiento y disminuye cuando se ha adquirido un cierto grado de desarrollo (Paiva y Machado, 2003). Ambos tipos, jóvenes y maduros, presentaron distribución no uniforme en todo el perímetro del tallo, coincidiendo esta distribución con lo manifestado por Vera Batista (2016) para *L. patersonii*.

El córtex parenquimático mostró un número variable de capas celulares en los tallos jóvenes, comprendidos entre 9-10. Las plantas de otros géneros, de la misma familia, mostraron diferente número, de 5-11 en *Finschia chloronxantha* y 9 en *Garnieria spathulifolia* (Catling, 2010), 6-7 en *Grevillea acuaria*, 1-3 en *G. sparciflora*, 2-8 en *Hakea* y 3-6 en *Persoonia* (Catling, 1996). Según Pérez Francés et al. (2001), *Leucadendron discolor* y *L. 'Safari Sunset'* presentaba de 10-15, y Vera Batista (2016) observó 20-30 en *P. obtusifolia* y 6-8 en *L. 'Sucesion I'*.

Los elementos vasculares se encontraron en la periferia de una médula ancha. En el parénquima cortical se identificaron numerosas células pétreas aisladas o en grupos de 2-3 en tallos jóvenes y maduros. Según Vera Batista (2016), también se observaron en *P. 'Susara'*, mientras que no se identificaron en *L. 'Sucesion I'*. Gokul et al. (1996) indicaron que estas células podrían conceder un soporte estructural y colaborar con el colénquima frente a los efectos del viento. Además, de su intervención en el transporte de agua (Heide-Jørgensen, 1990).

Los haces vasculares fueron colaterales, con crecimiento secundario en tallos maduros, y en fascículos en los jóvenes. La cantidad y tamaño de éstos difieren entre ellos. Sin embargo,

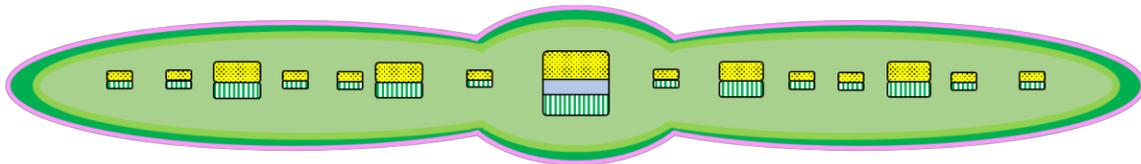
según Catling (1996; 2010) los haces vasculares de *Finschia*, *Garnieria*, *Grevillea*, *Hakea* y *Persoonia*, fueron eustélicos a sifonostélicos, rodeados por una banda continua de fibras.

El esclerénquima fue más predominante en los tallos maduros que en los jóvenes. Este tejido manifestó diferencias entre las plantas del género *Leucospermum* y *Protea*, siendo más abundantes en este último género (Vera Batista, 2016). Este tejido, su abundancia, se relacionó con un soporte de la adaptación de estas plantas al escleromorfismo/xeromorfismo (Fahn y Broido, 1963).

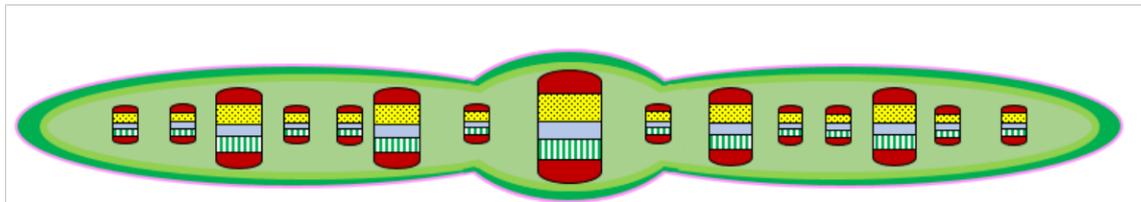
IV. 2. 2. 2. Resumen de las características tisulares

Esquemas de las secciones transversales de las hojas, jóvenes y maduras, de *Leucospermum* ‘Spider’ en los que se mostraron la distribución de los distintos tejidos.

Hoja joven



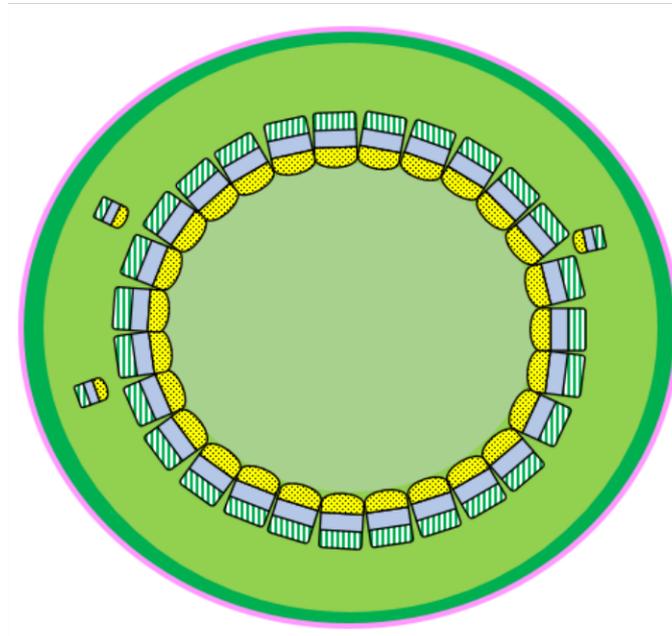
Hoja madura



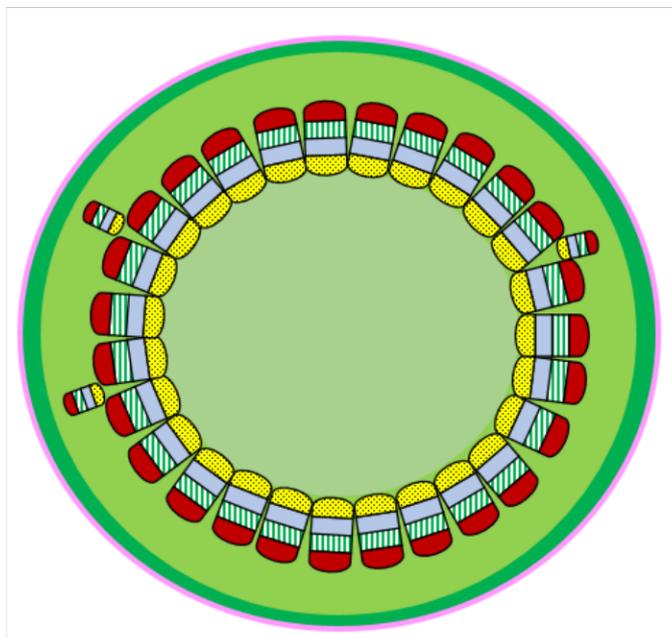
	Cutícula
	Epidermis
	Parénquima en empalizada
	Parénquima esponjoso
	Esclerénquima
	Floema
	Cambium vascular
	Xilema

Esquemas de las secciones transversales de los tallos, jóvenes y maduros, de *Leucospermum* 'Spider' en los que se mostraron la distribución de los distintos tejidos.

Tallo joven



Tallo maduro



	Cutícula
	Epidermis
	Córtex
	Esclerénquima
	Floema
	Cambium vascular
	Xilema
	Médula

IV. 2. 2. 3. Estudio de la anatomía de las estacas de *Leucospermum* ‘Spider’ tras la aplicación de los diferentes tratamientos

En este apartado se describió la anatomía de las estacas de *Leucospermum* ‘Spider’, después de cada uno de los tratamientos (Tr2, Tr5 y Tr6), y se comparó con la del prototipo (tallo) previamente estudiado.

Tratamiento 2 (2000 ppm de IBA)

La s.t. de la estaca en su parte superior presentó una distribución tisular similar a la s.t. del tallo prototipo (Fig. 6.1). En cambio, la porción basal (en contacto con el sustrato, una vez se eliminó éste), presentó numerosas protuberancias de distintos tamaños (Figs. 6.2 - 6.4), que se corresponden con la formación de callos y entre los cuales surgen algunas raíces (Figs. 6.2 - 6.3).

Las s.t. de la parte basal de las estacas mostraron crecimiento celular subepidérmico. El córtex formado por grandes células parenquimáticas, en mayor número que en el prototipo (Fig. 7.1); entre sus células se localizaron grupos celulares con características meristemáticas (meristemoides) que no manifestaron polaridad y se tiñeron intensamente con azul de toluidina (Fig. 7.1-7.1i). Además las células pétreas fueron más numerosas (Fig. 7.2).

El sistema vascular presentó alargamiento; los haces vasculares fueron colaterales, desordenados, y ya no se observó un anillo continuo alrededor de la médula (Fig. 6.5). Entre los elementos del xilema había filas radiales de parénquima xilemático con citoplasma intensamente teñido. La lignificación aumentó en los elementos del xilema, al igual que la acumulación de sustancias fenólicas (Fig. 7.3).

El cambium vascular manifestó gran actividad en el que se diferenciaron distintos planos de división celular, con aspecto de movimientos en diferentes sentidos (Fig. 6.5). Las divisiones celulares en distintos planos desarrollaron clúster de células que modificaron su dirección y originaron los callos (Figs. 6.5i-7.1i). Cambium vascular discontinuo, constituido por numerosas capas de células aplanadas y localizadas periféricamente a los elementos del xilema (Fig. 7.3).

Figura 6.- Fotomacrografías de microscopio estereoscópico y fotomicrografías a MO de la porción basal estacas después del Tr2

Fig. 6.1: S.t. de la estaca que mostró la disposición del córtex, haces vasculares y médula.

Fig. 6.2: Detalle de la s.t. de un callo.

Figs. 6.3 - 6.4: Panorámica de la parte basal de la estaca con numerosos callos y raíces.

Fig.6.5: Visión panorámica de la parte basal de la estaca, donde se observaron los diferentes planos que se desarrollan.

Fig. 6.5i: Detalle de la sección enmarcada de la Fig. 6.5. Obsérvese los meristemoides.

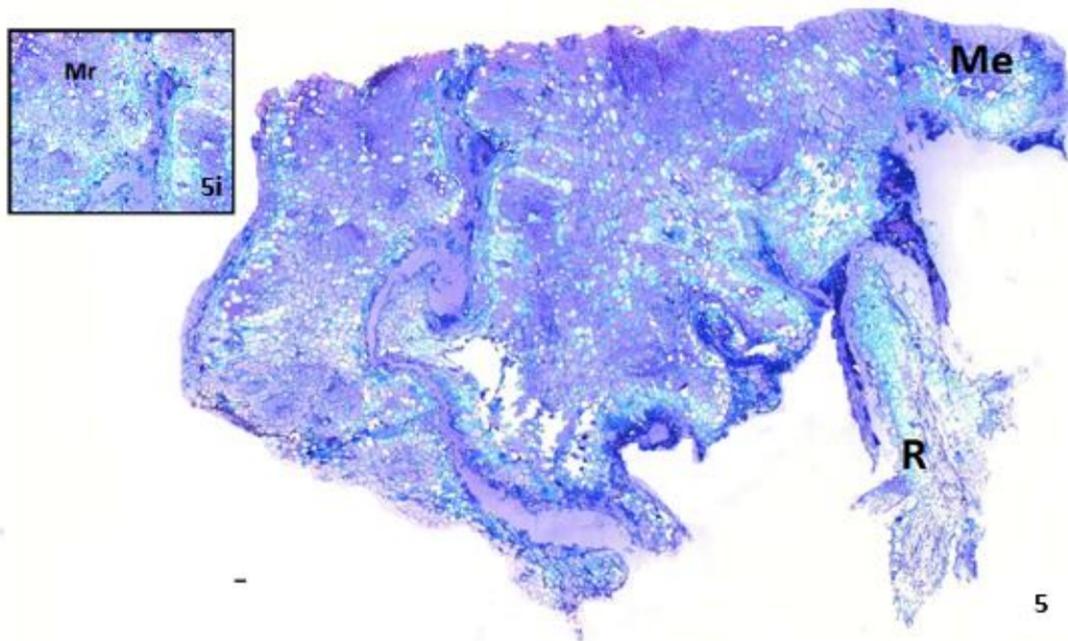
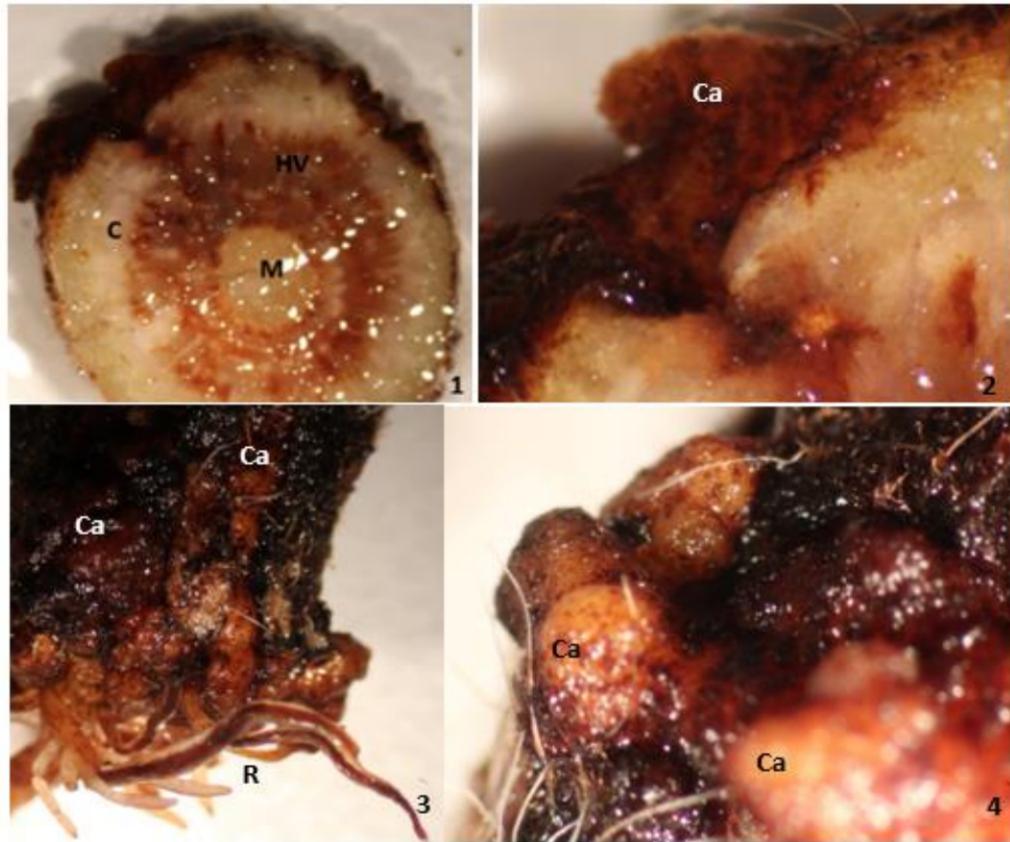


Figura 6.- Fotomicrografías al microscopio estereoscópico de la parte superior y basal de la estaca (1-4) de *Leucospermum* 'Spider' y fotomicrografías al MO de la parte basal de la estaca en s.t. (5-5i) después del Tr2. C: Córtex; Ca: Callo; HV: Haz Vascular; Me: Médula; CV: Cambium Vascular; R: Raíz; Mr: Meristemoide. Barras: 25 μ m: 5, 5i.

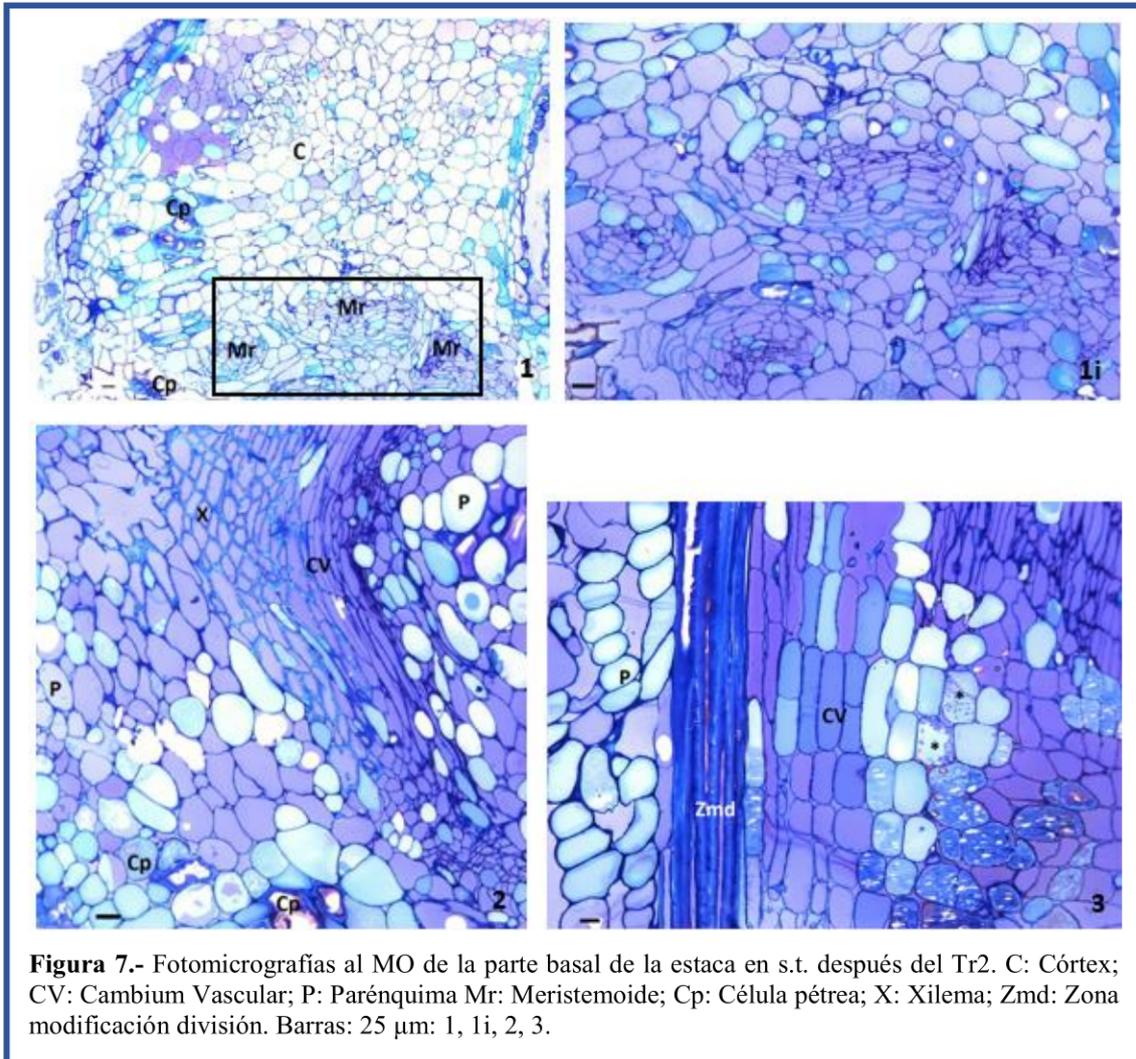
Figura 7.- Fotomicrografías a MO de la porción basal de las estacas después del Tr2

Fig. 7.1: S.t. del parénquima cortical y grupo de células pétreas.

Fig. 7.1i: Detalle de la zona enmarcada de la Fig. 7.1. Obsérvense los meristemoides.

Fig. 7.2: S.t. donde se pudo apreciar el xilema y el cambium vascular, rodeados de parénquima.

Fig. 7.3: Zona con modificación en los planos de las divisiones celulares.



Tratamiento 5 (peróxido de hidrógeno + 2000 ppm de IBA)

La s.t. de la estaca en su parte superior presentó una distribución tisular similar a la s.t. del tallo prototipo (Fig. 8.1). En cambio, la porción basal (en contacto con el sustrato, una vez se eliminó éste), presentó numerosas protuberancias de distintos tamaños (Figs. 8.2 - 8.3), que corresponden a la formación de callos y entre los cuales surgieron algunas raíces (Fig. 8.2).

Las s.t. de la parte basal de las estacas mostraron epidermis simple con pared tangencial gruesa y crecimiento celular subepidérmico. El córtex formado por grandes células parenquimáticas, en mayor número que en el prototipo (Fig. 9.1); entre sus células se localizaron grupos celulares con características meristemáticas (meristemoides) que no manifestaron polaridad y se tiñeron intensamente con azul de toluidina (Fig. 8.4-9.1). También se observaron numerosas células pétreas (Fig. 9.2).

El sistema vascular mostró alargamiento; haces vasculares colaterales, ordenados, que formaron un anillo continuo alrededor de la médula (Fig.8.4). Entre los elementos del xilema había filas radiales de parénquima xilemático con citoplasma intensamente teñido. La lignificación aumentó en los elementos del xilema, al igual que la acumulación de sustancias fenólicas (Fig. 9.3).

El cambium vascular expresó gran actividad en el que se diferenciaron distintos planos de división celular, a diferencia de las muestras prototipo, con aspecto de movimientos en diferentes sentidos (Fig. 8.4). Las divisiones celulares en distintos planos desarrollaron clúster de células que modificaron su dirección y originaron los callos (Figs. 8.4-9.1). Cambium vascular discontinuo, constituidos por numerosas capas de células aplanadas y localizadas periféricamente a los elementos del xilema.

Figura 8.- Fotomacrografías de microscopio estereoscópico y fotomicrografías a MO de la porción basal estacas después del Tr5

Fig. 8.1: Panorámica de una de las porciones obtenidas al seccionar la parte basal de la estaca para su posterior inclusión en resina. Obsérvese la disposición concéntrica de los tejidos: córtex, anillo de haces vasculares y médula.

Fig. 8.2: Panorámica de la parte basal de la estaca con numerosos callos y raíces.

Fig. 8.3: Detalle de la s.t. de un callo.

Fig. 8.4: S.t. que mostró esclerénquima, gran actividad del cambium vascular y alargamiento del haz vascular.

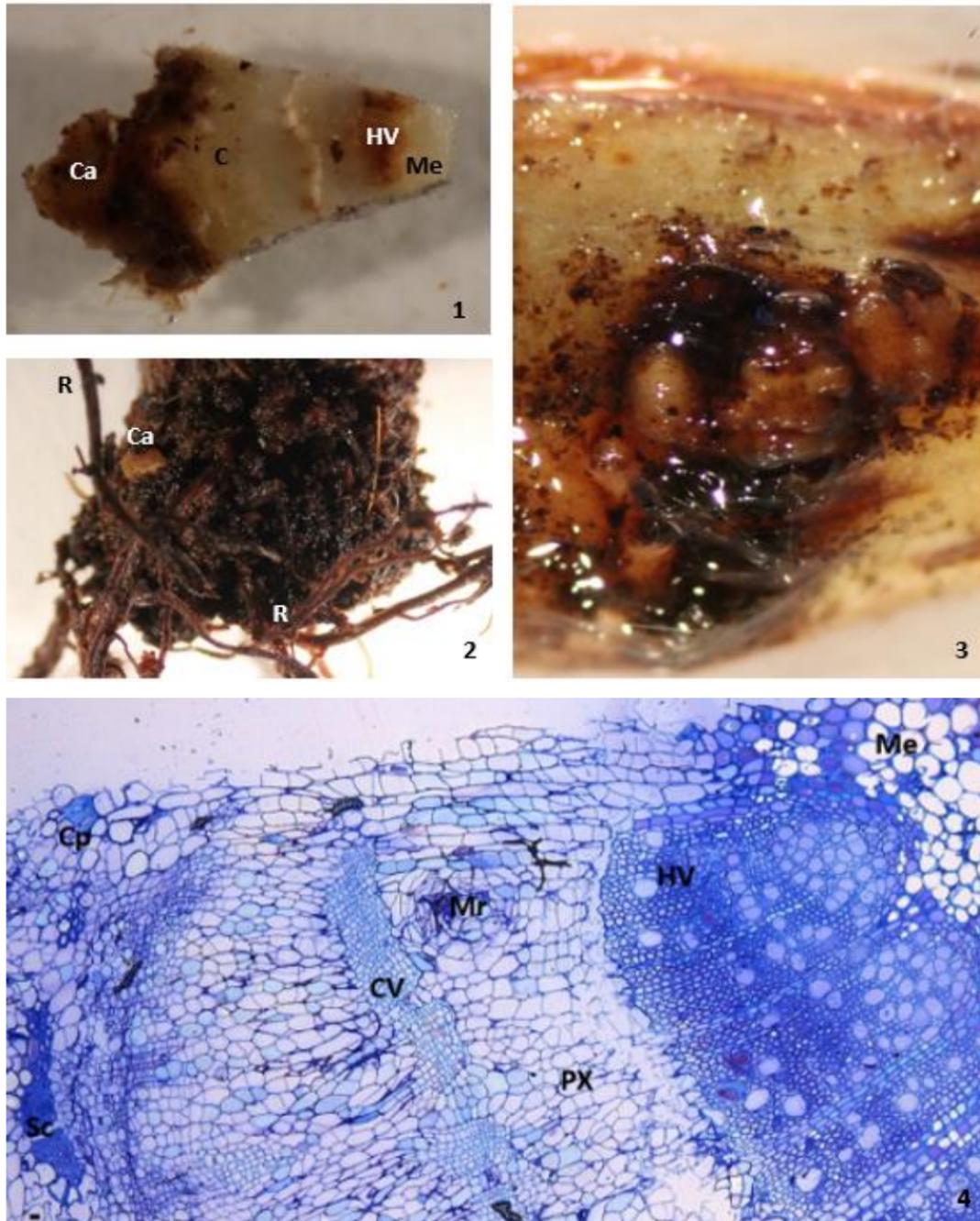


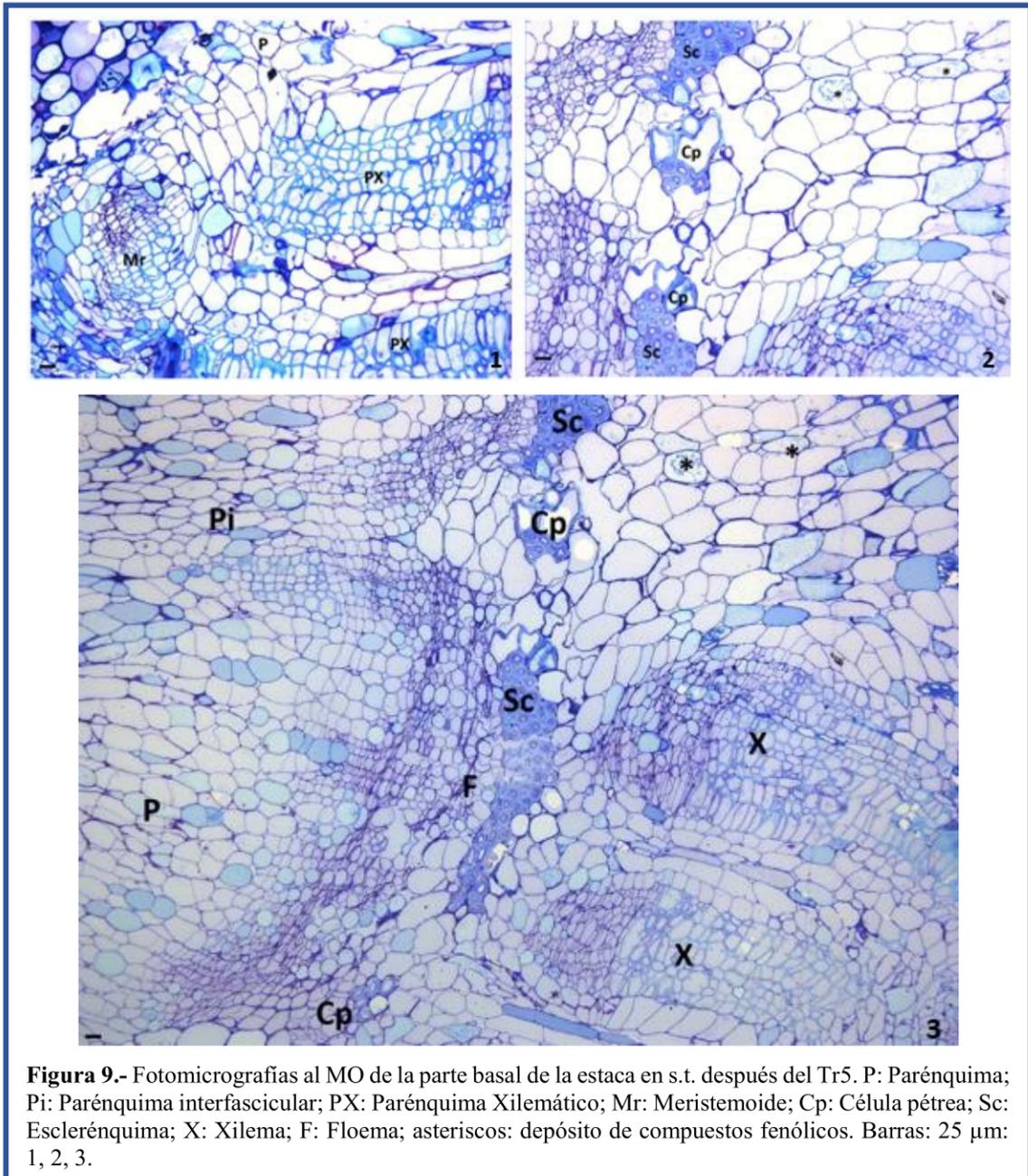
Figura 8.- Fotomacrografías al microscopio estereoscópico de la parte superior y basal de la estaca (1-3) de *Leucospermum* ‘Spider’ y fotomicrografías al MO de la parte basal de la estaca en s.t. (4) después del Tr5. C: Córtex; Ca: Callo; HV: Haz Vascular; Me: Médula; CV: Cambium Vascular; R: Raíz; Mr: Meristemoide; Cp: Célula pétrea; PX: Parénquima Xilemático. Barra: 25 μ m: 4.

Figura 9.- Fotomicrografías a MO de la porción basal de las estacas después del Tr5

Fig. 9.1: S.t. del parénquima cortical y parénquima xilemático. Obsérvense los meristemoides.

Fig. 9.2: S.t. donde se observó el esclerénquima y abundantes células pétreas, rodeados de parénquima.

Fig. 9.3: Bandas concéntricas de células cuyas características corresponden a xilema, cambium vascular y floema en el córtex. Además se distingue el esclerénquima, células pétreas y depósitos fenólicos.



Tratamiento 6 (peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA)

La s.t. de la estaca en su parte superior presentó una distribución tisular similar a la s.t. del tallo prototipo (Fig. 10.1). En cambio, la porción basal (en contacto con el sustrato, una vez se eliminó éste), presentó numerosas protuberancias de distintos tamaños (Fig. 10.2), que corresponden a la formación de callos y entre los cuales surgen algunas raíces (Figs. 10.3 – 10.4).

Las s.t. de la parte basal de las estacas mostraron epidermis simple con pared tangencial gruesa y crecimiento celular subepidérmico. El córtex formado por grandes células parenquimáticas, en mayor número que en el prototipo, éstas presentaron un aspecto desordenado (Fig. 10.5); entre sus células se localizaron grupos celulares con características meristemáticas (meristemoides) que no manifestaron polaridad y se tiñeron intensamente con azul de toluidina (Figs. 10.5-10.5a). Células pétreas numerosas (Fig. 11.2).

El sistema vascular expresó alargamiento; haces vasculares colaterales, ordenados, donde se observó un anillo continuo alrededor de la médula (Fig.11.1). Haces vasculares separados por parénquima interfascicular (Fig. 11.1). Entre los elementos del xilema había filas radiales de parénquima xilemático con citoplasma intensamente teñido. La lignificación aumentó en los elementos del xilema, al igual que la acumulación de sustancias fenólicas (Fig. 11.1).

El cambium vascular manifestó gran actividad en el que se diferenciaron distintos planos de división celular, a diferencia de las muestras prototipo, con aspecto de movimientos en diferentes sentidos. Las divisiones celulares en distintos planos desarrollaron clúster de células que modificaron su dirección y originaron los callos (Fig. 11.2). Cambium vascular discontinuo, constituido por numerosas capas de células aplanadas y localizadas periféricamente a los elementos del xilema.

Figura 10.- Fotomicrografías de microscopio estereoscópico y fotomicrografías a MO de la porción basal estacas después del Tr6.

Fig. 10.1: S.t. de la estaca que mostró la disposición del córtex, haces vasculares y médula.

Fig. 10.2: Detalle de la s.t. de un callo.

Fig. 10.3: Panorámica de la s.t. Obsérvese la disposición concéntrica de los tejidos, y las raíces en la parte basal de la estaca.

Fig. 10.4: Panorámica de la parte basal de la estaca con numerosas raíces.

Fig. 10.5: Visión panorámica de la parte basal de la estaca, donde se mostraron los diferentes planos que se desarrollan.

Fig. 10.5a: Detalle de la zona enmarcada de la Fig. 10.5. Obsérvese los meristemoides.

Fig. 10.5b: Detalle de la zona enmarcada de la Fig. 10.5. Obsérvese esclerénquima, gran actividad del cambium vascular y parénquima.

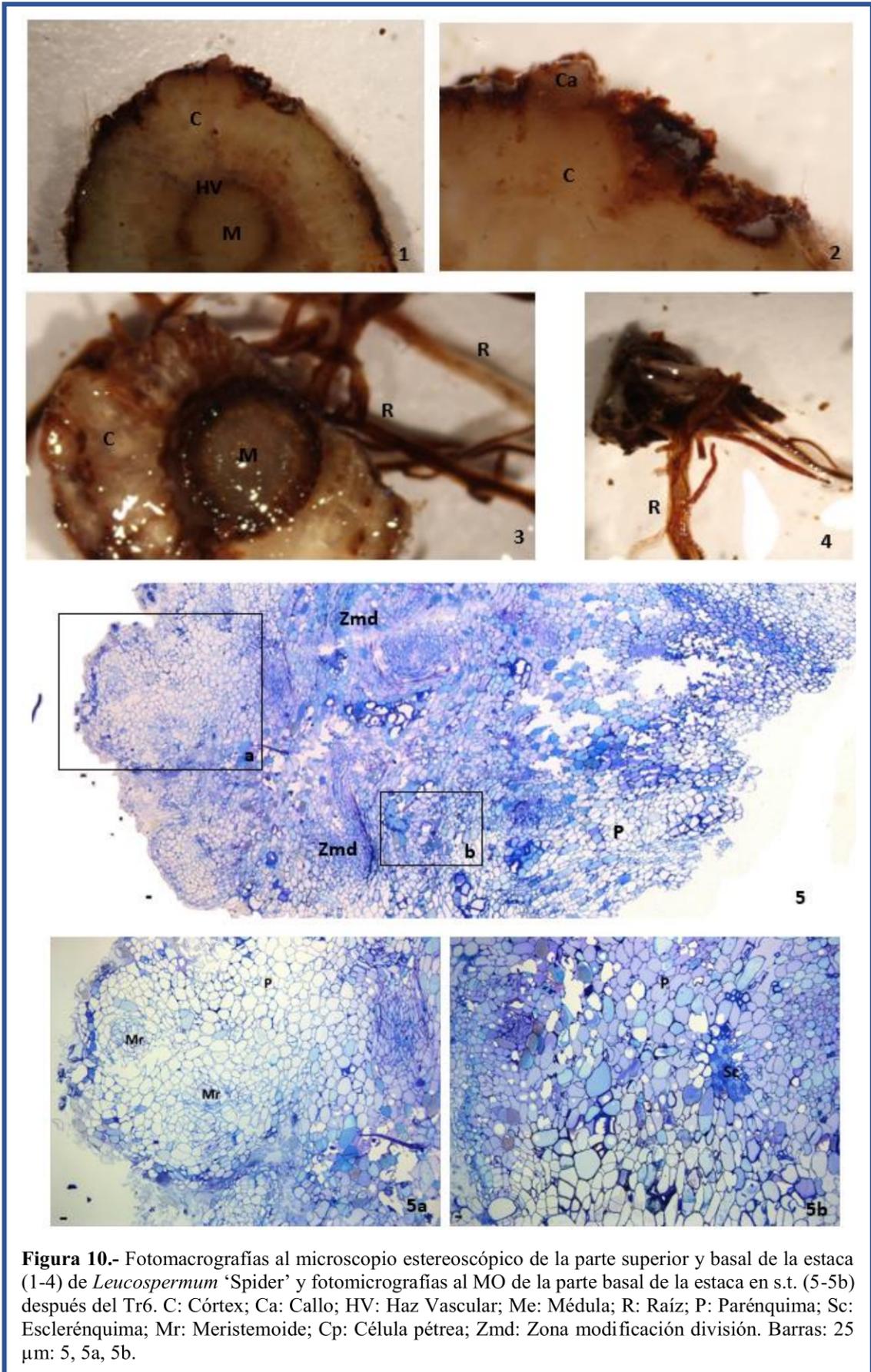


Figura 11.- Fotomicrografías a MO de la porción basal de las estacas después del Tr6

Fig. 11.1: S.t. del parénquima cortical. Obsérvese el alargamiento de los haces vasculares y entre ellos el parénquima interfascicular.

Fig. 11.2: S.t. con bandas concéntricas de células cuyas características corresponden a xilema, cambium vascular y floema en el córtex. Además se diferenció el esclerénquima y células pétreas.

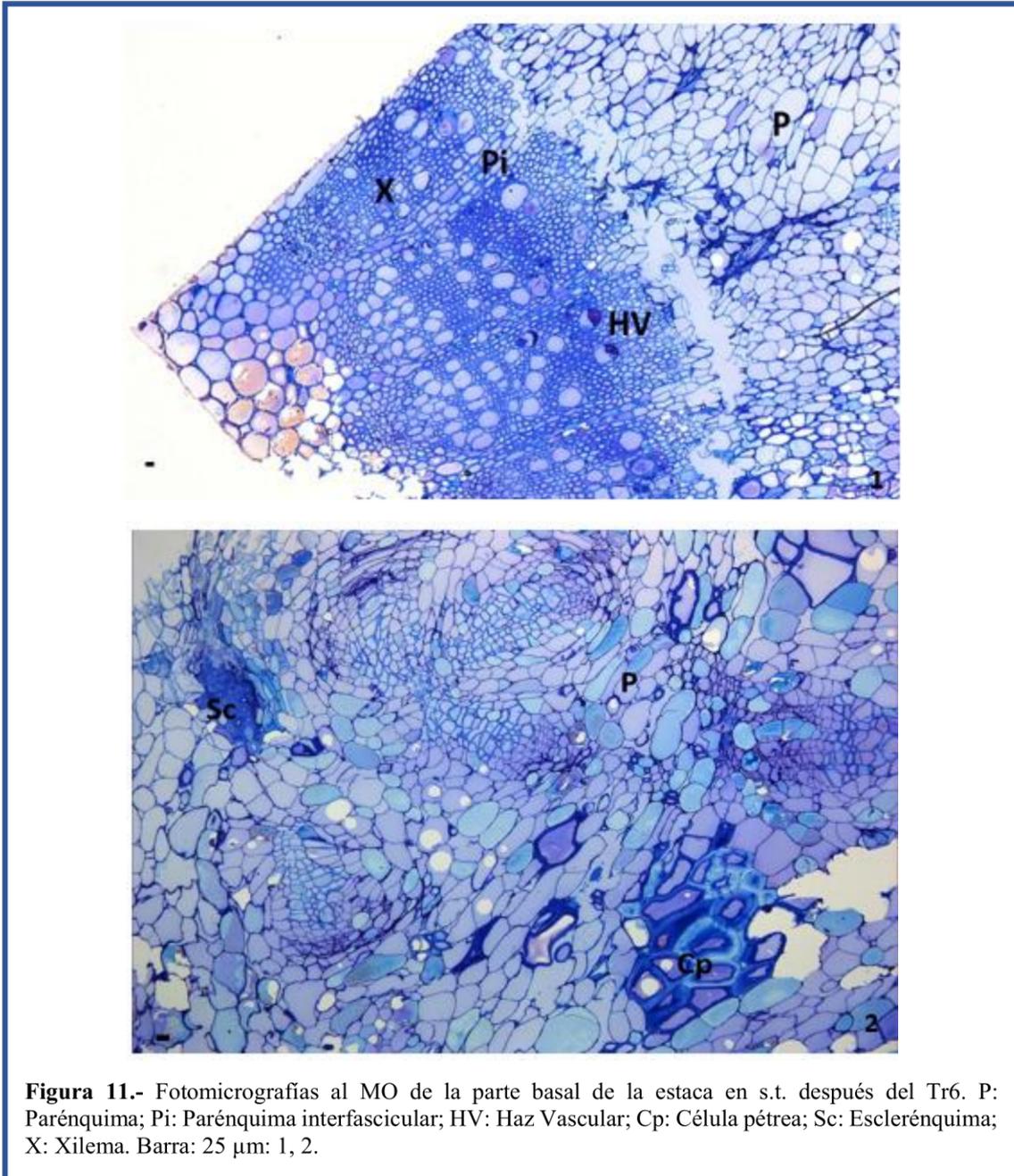


Figura 11.- Fotomicrografías al MO de la parte basal de la estaca en s.t. después del Tr6. P: Parénquima; Pi: Parénquima interfascicular; HV: Haz Vascular; Cp: Célula pétrea; Sc: Esclerénquima; X: Xilema. Barra: 25 μ m: 1, 2.

Discusión de las características estructurales de los tallos después de la aplicación de los diferentes tratamientos

Kibber et al. (2004) y Tworkoski y Takeda (2007) citaron que la generación de raíces adventicias de novo, a partir de diversas partes de la plantas, distintas a las del embrión, se deben a diferentes características de las células vegetales y estaba afectada por diversos factores tales como genotipo, tipo y fecha de recolección de las estacas y factores endógenos. Sin embargo, se podía potenciar o estimular dicha generación radicular, empleando reguladores de crecimiento (IBA, poliaminas) y sustancias de demostrada influencia, como el peróxido de hidrógeno, en dicha formación. La aplicación de diversos tratamientos (Tr2, Tr5 y Tr6) en la base de las estacas, del cultivar *Leucospermum* 'Spider', promovieron una serie de alteraciones en la anatomía de las mismas.

Estas alteraciones se distinguieron, visualmente, en las estacas, que se manifestaron con numerosas protuberancias que corresponden a la formación de callos. Éstos fueron bastante voluminosos y numerosos, sobre todo con el Tr2 (2000 ppm de IBA), seguido del Tr 5 (peróxido de hidrógeno + 2000 ppm de IBA), y por último el Tr6 (peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA).

Según Hartman y Kester (1989), con frecuencia, las raíces emergieron a través del callo, y por tanto la constitución de esta estructura parecía esencial para el enraizamiento. Sin embargo, algunas estacas a las que se les aplicó estos tratamientos aquí ensayados, no siempre presentaron callo y no condicionaron el enraizamiento. Los tratamientos aplicados en este Trabajo de Fin de Grado, hicieron que se formara el callo en la base de las estacas y emergieran las raíces. También surgían de las heridas realizadas al eliminarles las hojas de la estaca. Sin embargo, se cree que no hubo una relación secuencial obligatoria entre el callo y las raíces formadas, ya que en algunas ocasiones las estacas con numerosas raíces no presentaban callos, además, se observaron estacas con excelente callos que posteriormente no emitieron raíces. Esto también ocurrió en estacas de P. 'Pink Ice' (Vera Batista, 2016). Según Howard (1971) cuando ocurre simultáneamente se debe a la dependencia de condiciones internas y ambientales similares.

Las s.t. de las estacas sometidas a los tratamientos, y observadas a MO, mostraron una cierta ampliación del haz vascular, en los Tr5 y Tr6, además de gran actividad meristemática localizada en el cambium vascular, con divisiones en diferentes planos que dieron lugar a clúster desiguales que constituyeron los callos, y diferenciaciones con distribución circular que dieron origen a las nuevas raíces.

Como ocurrió en las estacas objeto de estudio, según Fogaca y Fett-Neto (2005), en la fase de iniciación, los efectos de esta hormona (IBA) se podía manifestar en diversos tejidos siempre que en ellos las agrupaciones de células maduras recuperasen su habilidad de división celular.

Las estacas tratadas con peróxido de hidrogeno en combinación con IBA presentaron, en general, mayor actividad meristemática, que cuando se aplicó la hormona sola.

Según Li et al. (2009), la aplicación de peróxido de hidrogeno promueve un mayor número de raíces adventicias como sucedió en *Vigna radiata*. Así, las estacas de *Leucospermum* ‘Spider’, tratadas con peróxido de hidrogeno en combinación con la hormona presentaron raíces más numerosas y de mayor tamaño (cepellón compacto) que cuando se aplicó la hormona sola.

Una respuesta común en los tres tratamientos estudiados fue el aumento del tejido esclerenquimático, al igual que el aumento de células pétreas, tanto individuales como agrupadas. Este tejido como indicó Evert y Eichhom (2007) se encuentra influenciado en su desarrollo por las fitohormonas. Heide-Jorgensen (1990) postuló que las células pétreas proporcionaban resistencia mecánica a la estaca aunque podrían colaborar en el transporte de agua. Sin embargo, para Hartman y Kester (1989) la presencia de tejido esclerenquimatoso podría estar relacionado con el problema para enraizar que manifestaron las plantas leñosas. En otros ensayos, se observó que no había relación general entre la presencia de tejidos que pueda ser considerada como barrera en la creación de raíces (Kachecheba, 1975).

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

De los resultados de este Trabajo Fin de Grado se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. *Leucospermum* 'Spider' puede propagarse, en las condiciones en que se realizó este ensayo, mediante el uso de:
 - a) IBA a una concentración de 2000 ppm, ya que ésta es suficiente para conseguir estacas trasplantables desde las primeras semanas, no mostrando diferencias significativas cuando se aumentó la concentración ni cuando se combinó en diferentes concentraciones con el peróxido de hidrogeno.
 - b) Peróxido de hidrógenos al 3,5% aplicado solo, ya que aunque no se obtuvo el mejor porcentaje de estacas trasplantables, se lograron valores aceptables en el enraizamiento de esta familia. Además, no se contabilizaron estacas muertas.
 - c) IBA + peróxido de hidrogeno, que mejoró el porcentaje de estacas trasplantables que con el uso de peróxido de hidrógeno solo. Sin embargo, es suficiente con la aplicación de IBA para obtener porcentajes elevados de estacas trasplantables.

Sin embargo el uso de etanol al 50% no es suficiente para conseguir un valor superior al 10% de estacas trasplantables.

2. La presencia de callos no condicionó el enraizamiento en este ensayo, las estacas tratadas con 4000 ppm de IBA nunca produjeron callo, mostrando un 80% de estacas trasplantables.
3. Los callos se formaron preferentemente en la base de las estacas, además, en los tratamientos de 2000 ppm IBA, peróxido de hidrogeno + 2000 ppm de IBA y peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA; se produjeron en las heridas donde se eliminaron las hojas.
4. Las hojas y tallos mostraron modificaciones estructurales atribuibles a las condiciones del desarrollo presentando menor grosor de la cutícula y de la pared tangencial externa de las células epidérmicas, variación de la ornamentación de los tricomas y exigüidad de los depósitos fenólicos, en los ejemplares jóvenes respecto a los maduros.

5. Las hojas mostraron isobilateralidad, estomas paracíticos en ambas superficies foliares y haces colaterales más desarrollados en los ejemplares adultos.
6. Los haces vasculares caulinares se distribuyen apretadamente en torno a la médula tanto en los ejemplares jóvenes como adultos.
7. Los caracteres estructurales mostraron mayor grado de esclerofilia en los ejemplares adultos que en los jóvenes.
8. La aplicación de los diferentes tratamientos generó una serie de cambios anatómicos en los tallos, y observados a MO, como fueron: una mayor actividad meristemática en la zona cambial y en el córtex, siendo más notable en los se combinó el peróxido de hidrogeno con IBA.
9. Alargamiento de los haces vasculares en los tratamientos con peróxido de hidrógeno + 2000 ppm de IBA y peróxido de hidrógeno + 4000 ppm de IBA. En menor grado para el tratamiento 2000 ppm de IBA.
10. Un aumento del tejidos esclerenquimático y células pétreas, tanto individuales como agrupadas, en todos los tratamientos estudiados, y cuya presencia no puede considerarse como barrera en la producción de raíces.

CONCLUSIONS

From the results of this end-of-degree project the following conclusions were obtained:

1. *Leucospermum* 'Spider' may be spread, in the conditions used in this trial, through the use of:
 - (a) IBA in a 2000 ppm concentration, because this is sufficient to obtain transplantable cuttings from the first few weeks, not showing significant differences when the concentration was increased or when combined in different concentrations with the hydrogen peroxide.
 - (b) Only applying hydrogen peroxide at 3.5%, alone since the best percentage of transplantable cuttings were not obtained, acceptable values were gained in the roots of this family. In addition, dead cuttings were not included.
 - (c) IBA + hydrogen peroxide, which improved the percentage of transplantable cuttings instead of using only hydrogen peroxide. However, to get high percentages of transplantable cuttings it is enough with the application of IBA.

However the use of ethanol at 50% is not enough to get a value greater than 10% of transplantable cuttings.

2. The presence of calluses did not condition the rooting in this essay, the cuttings treated with 4000 ppm of IBA never produced callus, showing an 80% of transplantable cuttings.
3. The calluses were formed preferably in the base of the cuttings, besides, in the 2000 ppm IBA treatments, the hydrogen peroxide + 2000 ppm of IBA and hydrogen peroxide + 4000 ppm of IBA; they were produced in the wounds where the leaves were removed.
4. Leaves and stems showed structural changes attributable to the development conditions presenting a thinner cuticle and a thinner outer tangential wall of epidermal cells, a variation in the ornamentation of the trichomes and a shortage of the phenilic deposits, in the young specimens regarding the mature ones.
5. The leaves showed isobilaterally, paracitic stomatas on both leaf surfaces and collateral bundles which were more developed in the adult specimens.
6. The vascular cauline bundles are distributed tightly around the pith both in the young specimens as in the adult ones.

7. Structural characters showed a higher degree of sclerophyllous in adult specimens than in young people.
8. The application of different treatments generated a series of anatomical changes in stems, and observed by OM, as were: increased meristem activity in the cambial zone and in the cortex, being most pronounced in ones that were combined with hydrogen peroxide with IBA.
9. Lengthening of the vascular bundles in the treatments with hydrogen peroxide + 2000 ppm of IBA and hydrogen peroxide + 4000 ppm of IBA. To a lesser degree for the treatment of 2000 ppm of IBA.
10. An increase of the sclerenquimatic tissue and stone cells, both individual and grouped cells in all the studied treatments, and whose presence cannot be considered as a barrier in the production of roots.

VI. PROPUESTAS DE FUTURO

VI. PROPUESTAS DE FUTURO

Conforme a los resultados expuestos anteriormente, el siguiente paso para completar este estudio, sería analizar lo que sucede histológicamente en las estacas, de *Leucospermum* ‘Spider’, cuando se aplica etanol 50%, Tr1 (control), y las estacas tratadas únicamente con peróxido de hidrógeno (Tr4) e IBA en mayor concentración (Tr3), para comprobar y comparar con los tratamientos estudiados (Tr2, Tr5 y Tr6).

Asimismo, el estudio de la actividad peroxidasa, en este cultivar, usada como un marcador para identificar las sucesivas fases de enraizamiento y temporización de cada una de estas fases.

Además sería interesantes el estudio de hojas y tallo a nivel de microscopía electrónica de transmisión.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ackerman, A.E.** 1993. Transport and metabolism of indole 3 butyric acid in cuttings of *Leucadendron discolor*. *Plant Growth Regulation* 12 (1-2):17-22.
- Álvarez, M.E., R.I. Pennell, P.J. Meijer, A. Ishikawa, R.A. Dixon y C. Lamb.** 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Plant Cell* (92):773-784.
- Alvin, K.L.** 1982. Cheirolepidiaceae - biology, structure and paleo-ecology. *Review of Paleobotany and Palynology* 37(1-2):71-98.
- Amri, E., H.V.M. Lyaruu, A.S. Nyomora y Z.L. Kanyeka.** 2010. Vegetative propagation of African Blackwood (*Dalbergia melanoxylon* Guill. & Perr.): effects of age of donor plant, IBA treatment and cutting position on rooting ability of stem cuttings. *New Forest* (39): 183-194.
- Asmoshtaghi, E., A.R. Shahsavari.** 2011. The effect of IBA and H₂O₂ on rooting of two olive cultivars. *Journal of Chemical Health Risks* 1(1):35.38.
- Bachman, G.R.** 2008. Plant propagation. Concepts and Laboratory exercises. Chapter 22. Ed. Caula A., Bey I. and Robert N. Trigiano. New York.
- Bagni, N., B. Malucelli y P. Torrigiani.** 1992. Polyamines: a new class of growth substances. En: Karssen, C.M., L.C. Van Loon y D. Vreugdenhil. (ed.) *Progress in plant growth regulation*. Klumer Academic Pub. Dordrecht. The Netherland. pp 264-275.
- Becker, M., G. Kersteins y J. Schöherr.** 1986. Water permeability of plant cuticles: permeation, diffusion and partition coefficients. *Trees* (1): 54-60.
- Benic, L.M.** 1986. Pathological problems associated with propagation material in protea nurseries in Suth Africa. *Soil. Soc. Amer. Proc.* 13:224-226.
- Ben-Jaacov, J., A. Ackerman, S. Gilad, R. Carmeli, A. Barzilay e Y. Shochori.** 1992. Grafting techniques and use of rootstocks in *Leucadendron* and the other Proteaceous plants. *Acta Horticulturae* (316): 69-71.
- Bertram, L.** 1992. Phycological background for regulation of adventitious root formation by the irradiance to stock plants: a hypothesis. *Acta Horticulturae* (314):291-300.

- Blazich, F.A.** 1988. Chemical and formulations used to promote adventitious rooting. En: Davies, T.A., B. Haissing, N. Sankhla. (ed.). Adventitious root formation in cutting. Portland, Oregon: Discorides Press.
- Blomerus, I.M.** 2014. Effect of vegetative growth cycle, time of day and container size on vegetative propagation success of *Protea* cultivars. *Acta Horticulturae* (1031):45-55.
- Blomerus, I.M. y D.G. Malan.** 2014. Effects of delayed IBA treatments on rooting of *Protea* cultivars 'Niobe', 'Lady Di', 'Pinita', 'Susara' and 'Pink Ice'. *Acta Horticulturae* (1031): 57-66.
- Brits, G. J.** 1986. The influence of genotype, terminality and auxin formulation on the rooting of *Leucospermum* cutting. *Acta Horticulturae* (185):23-30.
- Brits, G.J.** 1984. Production research on South African proteas: Current trends. *Veld & Flora* 70(4):103-105.
- Brits, G.J.** 1992. The VOPI diversifies its protea cultivar releases. *J. Int. Protea Assoc.* 24:19-25.
- Brits, G.J. y S.L. Von Broembsen.** 1978. *Protea* cultivation: *Phytophthora* root and collar rot. Flowers and Ornamental Shrubs. Pretoria: Government of South Africa.
- Brodribb, T.J., G.J. Jordan y R.J. Carpenter.** 2013. Unified changes in cell size permit coordinated leaf evolution. *New Phytologist* (199): 559-570.
- Carpenter, R.J., R.S. Hill y G.J. Jordan.** 2005. Leaf cuticular morphology links Platanaceae and Proteaceae. *Int. J. Plant Sci.* 166(5): 843-855.
- Catling, D.M.** 1996. The systematic anatomy of *Grevilleae* and *Persooniinae* (Proteaceae). Durham Theses. Durham University. Available at Durham E-Theses Online.
- Catling, D.M.** 2010. Vegetative anatomy of *Finschia* Warb and its place in Hakeinae (Proteaceae). *Telopea*. 12(4):491-504.
- Cooper, W.C.** 1935. Hormones in relation to root formation on stem cutting. *Plant Physiology* (10): 789-794.
- Couvillon, G.A.** 1988. Rooting response to different treatments. *Acta Horticulturae* (227): 187-201.

- Criley, R.A. y P.E. Parvin.** 1979. Promotive effects of auxin, ethefon and daminocide on rooting of *Protea neriifolia* cutting. Journal of the American Society for Horticultural Science 104(5): 592-596.
- Davies, P.J.** 1995. The Plant Hormones: Their nature, occurrence and functions. En: Davies, P.J. (ed). Plant Hormones. Kluwer Academic. pp 1-12.
- Davis, T.D.** 1988. Effect of shoot growth retardants and inhibitor on the rooting. En: Davis, T.A., B. Haissing, N. Sankhla. (ed.) Adventitious root formation in cutting. Portland, Oregon: Discorides Press.
- Day, T.A., G. Martin y T.C. Vogelmann.** 1993. Penetration of UV-B radiation in foliage: Evidence that the epidermis behaves as a non-uniform filter. Plant Cell Environment (16):735-741.
- Devlin, R.M.** 1980. Fisiología vegetal. 3ªEd. Barcelona: Omega, S.A. 517 pp.
- Dillon, R.J.** 2002. The diversity of scleromorphic structures in the leaves of Proteaceae. Honors Thesis. University of Tasmania, Hobart, Australia.
- Edwards.** 1979. An evaluation of wounding and hormones on the rooting of cuttings. Royal Zealand Institute of Horticulture Annual Journal (7): 74-82.
- Ehleringer, J., O. Bjorkman y H.A. Mooney.** 1976. Leaf pubescens: effects on absorbance and photosynthesis in a desert shrub. Science (192): 376-380.
- Eliovson, S.** 1983. Proteas for pleasure: How to grow and identify them. 6ª Ed. Johannesburg: MacMillan South Africa. 230 pp.
- Ellyard, R.K. y G. Butler.** 1985. Breakthrough in waratah propagation. Australian Horticulture: 27-28. Citado por: Rodríguez Pérez, J.A. 1989. Introducción, estudio y evaluación de proteas para flor cortada en la isla de Tenerife. Tesis Doctoral. Facultad de biología. Universidad de La Laguna.
- Evert, R.F. y S.E. Eichhorn.** 2007. Esau's Plant Anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function and development. 3ª Ed. Hoboken. New Jersey: Wiley-Interscience. 610 pp.
- Fahn, A.** 1985. Anatomía vegetal. Madrid: Ediciones Pirámide, S.A. 599 pp.
- Fahn, A. y Cutler, D.F.** 1992. Xerophytes. Berlin: G. Borntraeger. 176 pp.

- Fanh, A. y S. Broide.** 1963. The primary vascularization of the stem and leaves of the genera *Salsola* y *Suaeda* (Chenopoidaceae). *Phytomorphology* (13): 156-165.
- Faruchi, Y., A. Ackerman, S. Gilad, J. Ben-Jaacov y J. Riov.** 1997. Improved methods for rooting cuttings of *Protea obtusifolia*. *Acta Horticulturae* (453): 153-157.
- Fogaca, C.M. y A.G. Fett-Neto.** 2005. Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of *Eucalyptus* species differing in recalcitrance. *Plant Growth Regulation* 45(1): 1-10.
- Fujino, M.** 1984. *Telopea* genus. En: Tsukamoto, Y. y D. Kakiengai. (ed.) *Encyclopedia Flower Sciences*. Yohkendo. Tokyo. Japan.
- Galston, A.W. y R. Kaur-Sawhney.** 1995. Polyamines as endogenous growth regulators. En: Davies, P.J. (ed.) *Plant hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. 2º Ed. Kluwer. Dordrecht. Hollande. 158-178 pp.
- Gokul, H., D.H. Thejavalhi y S. Joshi.** 1996. Differentiation of sclerenchyma fibers in stem cultures of *Cissampelos pareira* L. (Menispermaceae). *Current Science* 70:263-264.
- Gómez Campo, C.** 1979. Hormonas vegetales. Monografía de Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. 49 pp.
- González, C.C., M.A. Gandolfo, y R.N. Cúneo.** 2004. Leaf architecture and epidermal characters of the argentinean species of Proteaceae. *Int. Journal of Plant Sciences*. 165(4): 521-536.
- Gouws, I., G. Jacobs y D.K. Strydom.** 1990. Factors affecting rooting and auxin absorption in stem cuttings of *Protea*. *Journal of Horticultural Science* 65 (1):59-63.
- Greenhalgh, F.C.** 1983. Diseases of proteaceous plants. *Growing and Marketing of Proteas*. Vol. I. Australia, Melbourne: Proteaflora Enterprises. pp 30-38.
- Groom, P.K., B.B. Lamont y A.S. Markey.** 1997. Influence of leaf type and plant age on the leaf structure and sclerophylly in *Hakea* (Proteaceae). *Australian Journal of Botany* (45): 827-838.
- Groom, P.K., B.B. Lamont y L. Kupsky.** 1994. Contrasting morphology and ecophysiology of co-occurring broad and terete leaves in *Hakea trifurcate* (Proteaceae). *Australian Journal of Botany* (42): 307-320.

- Haber, A.H. y D.E. Foard.** 1963. Nonessentiality of concurrent cell division for degree of polarization of leaf growth. Evidence from untreated plants and from chemically induced changes of the degree of polarization 50(2): 937-944.
- Hansen, J.** 1988. Influence of gibberellins on adventitious root formation. En: Davis, T.A., B. Haissing, N. Sankhla. (ed.) Adventitious root formation in cuttings. Dioscorides Press. Portland. Oregon.
- Harre, J.** 1988. Proteas. The propagation and production of Proteaceae. New Zealand: Fielding. 211 pp.
- Hartmann, H.T, D.E. Kester y J.T. Davies.** 1990. Plant propagation. Principle and practices. 5^oEd. New Jersey: Prentice-Hall.
- Hartmann, H.T. y D.E. Kester.** 1989. Propagación de plantas, principios y prácticas. México: Compañía Editorial Continental, S.A.
- Hartmann, H.T. y D.E. Kester.** 1992. Propagación de plantas. México DF: CECOSA.
- Hasegawa, A., K. Takeda y G.A. Reynoso-Castillo.** 2010. Morphological characteristics and propagation of *Helicia cochinchinensis* Lour. (Proteaceae): a native shrub of the northern hemisphere. Acta Horticulturae (869):165-171.
- Heide-Jorgensen, H.S.** 1990. The xeromorphic leaves of *Hakea suaveolens*. R. Br. IV. Ontogeny, structure function of the sclereids. Australian Journal of Botany (38):25-43.
- Hess, C.E.** 1962. Characterization of the rooting co-factors extracted from *Hedera helix* L. and *Hibiscus rosa sinensis* L. Proc. 16 th International Horticultural Congress: 382-388.
- Howard, B.H.** 1971. Propagation techniques. Scientia Horticulturae (23): 166-126.
- Hung, K.T., Y.T. Hsu y C.H. Kao.** 2006. Hydrogen peroxide is involved in methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves. Plant Physiology (127): 293-303.
- Hutchinson, J.** 1959. The Families of Flowering Plants. Dicotyledons. Vol. I. Oxford: Clarendon Press.
- Jacobs, G.** 1983. Vegetative propagation of Proteas. Recent Developments. Growing & Marketing of Proteas. Ed. Peter Mathews.

- Jacobs, G. y J.C. Steenkamp.** 1975. Proteas: the rooting of stem cuttings. Farming in South Africa, Series: Flowers, ornamental shrubs and trees, B. 3. Department of Agricultural Technical Services. Pretoria.
- Jacobs, G. y J.C. Steenkamp.** 1976. Rooting stem cuttings of *Leucospermum cordifolium* and some of its hybrids under mist. Farming in South Africa, Series: Flowers, ornamental shrubs and trees, B. 7. Department of Agricultural Technical Services. Pretoria.
- Jamieson, A.C.** 1985. Proteaceae flower and foliage production. N. Z. Ministry of Agriculture and Fishers. Aglink HPP 106:1-4. Citado por: Santana, T. 2012. Efecto del lesionado, aplicación de hormonas (IBA) y condiciones ambientales sobre la propagación por estacas de tallo de *Leucospermum* 'Spider'. Trabajo Fin de Carrera. Director/es: Rodríguez Pérez, J.A. y A.M. De León. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria. Universidad de La Laguna.
- Jefthas, E. y G. Van der Berg.** 1995. Rooting of cuttings. In Fynbos cultivation ARC: Fynbos Unit. Elsenburg. Sudafrica: 59-66.
- Johansen, D.A.** 1940. Plant Microtechnique. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Jordan, G.J., R.A. Dillon y P.H. Weston.** 2005. Solar radiation as a factor in the evolution of scleromorphic leaf anatomy in Proteaceae. American Journal of Botany 92(5):789-796.
- Kachecheba, J.L.** 1975. Anatomical aspects of the formation and growth of roots in stem cutting of some species of *Hibiscus*. I. stem anatomy and its relation to the formation and growth of roots. Journal of Horticultural Research (14): 57-67.
- Kesari, V. y A. Krihnamachari.** 2008. Effect of auxin on adventitious rooting from stem cuttings of candidate plus tree *Pongamia pinnata* (L.), a potential biodiesel plant. Journal Trees: Structure and Function, 23 (3): 597-604.
- Kibber, H., M.E. Johnston y R.R. William.** 2004. Adventitious root formation in cutting of *Backhousia citriodora* F. Muell 1. Plant genotype, juvenility and characteristics of cuttings. Scientia Horticulturae (102): 133-143.
- Knox-Davies, P.S., P. Wyk y W.F.O. Marasas.** 1986. Diseases of Protea, *Leucospermum* and *Leucadendron* recorded in South Africa. Phytophylactica 19: 327– 337.

- Kögl, F., A. Haagen-Smit y H. Erxleben.** 1934. Über ein neues Auxin (Heteroauxin) aus Harn. XI Mitteilung. Z. Physiol. Chem, 228:90. Citado por: Devlin, R.M. 1980. Fisiología vegetal. 3ªEd. Barcelona: Omega, S.A. 517 pp.
- Köppen, W.** 1900. Versuch einer klassifikation der klimate, vorzugsweise nach ihren beziehungen zur pflanzenwelt. Geographische Zeitschrift 6: 593-611.
- Krisantini, S., M. Johnston, R.R. Williams y C. Beveridge.** 2003. Propagation of *Grevillea*. Plant Propagator's Society (53): 154-158.
- Krisantini, S., M. Johnston, R.R. Williams y C. Beveridge.** 2006. Adventitious root formation in *Grevillea* (Proteaceae) an Australian native species. Scientia Horticulturae (107): 171-175.
- Krisantini, S., M. Johnston, R.R. Williams y C. Beveridge.** Propagation of *Grevillea*. [En línea]. 2011. <<http://www.researchgate.net/publication/37617065>> [Consulta: 12 abril 2016].
- Lamont, B.** 1986. The significance of proteoid roots in proteas. Acta Horticulturae 185:163-170.
- León, F., C. Alfayate, C. Vera Batista, A. López, M. Rico y I. Brouard.** 2014. Phenolic compounds, antioxidant activity and ultrastructural study from *Protea* hybrid 'Susara'. Industrial Crops and Products (55):230-237.
- Levin, D.A.** 1973. The role of trichomes in plant defense. The quarterly review of Biology (48):3-15.
- Li, S.W., L. Xue, S. Xu, H. Feng y L. An.** 2009 a. Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung vean seedlings. Environmental and Experimental Botany (65): 63-71.
- Li, S.W., L. Xue, S. Xu, H. Feng y L. An.** 2009. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. The Botanical Review 75(2): 230-247.
- Liao, W.B., H.L. Xiao y M.L. Zhang.** 2010. Effects of nitric oxide and hydrogen peroxide on adventitious root development from cutting of ground-cover Chrysanthemum and associated biochemical changes. Journal of Plant Growth Regulation (29): 338-348.
- Ludwing-Müller, J.** 2000. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. Plant Growth Regulation (32): 219-230.

- MacMillan, B.P.** 1990. La multiplicación de las plantas. Barcelona: Folio S.A. 192 pp.
- Malan, D.G.** 1988. Propagation of Proteas by cuttings. Sappex Special Edition: 11-14.
- Malan, D.G.** 1989. Rooting and graft compatibility of hybrid *Leucospermum* cuttings. International Protea Association Journal (20):65-66.
- Malan, D.G.** 1992. Propagation of Proteaceae. Acta Horticulturae (316): 27-34.
- Martínez, F.X. y J.F. Águila.** 1989. El enraizado de esquejes de plantas ornamentales. Horticultura (93): 9-43.
- Maughan, J.** 1983. Diseases and Pest cultivated proteaceous plants. Proceeding of the National Technical Workshop on production of the Seminar on production and marketing of Wildflowers. Western Australian Department of Agricultural. 101-103.
- Melillo, M.T., P. Leonetti, M. Bongiovanni, S.P. Astagnone y Z.T. Blevé.** 2006. Modulation of reactive oxygen species activities and hydrogen peroxide accumulation during compatible and incompatible tomato root knot nematode interactions. New Phytologist (170): 501-512.
- Meynhardt, J.T.** 1974. Propagation of Proteas. Farming in South Africa, Series: Flowers, ornamental shrubs and trees, B.2. Horticultural Research Institute. Pretoria.
- Miller, C.O., F. Skoog, M.H. Von Saltza y F.M. Strong.** 1955. Kinetin: a cell division factor from deoxyribonucleic acid. J. Am. Chem. Soc. 77: 1392. Citado por: Devlin, R.M. 1980. Fisiología vegetal. 3ªEd. Barcelona: Omega, S.A. 517 pp.
- Moffat, J y L. Turnbull.** 1993. Grafting Proteas. Pub. By the autor: Nanju Protea Nursery. Mail Center 582. Toowoomba. QLD 4532. Australia.
- Mole, S., J.A.M. Rosso y P.G. Waterman.** 1988. Light-induced variation in phenolic levels in foliage of rain-forest plants. I. Chemical changes. Journal of Chemical Ecology (14):1-21.
- Mott, K.A., A.C. Gibson y J.W. O'Leary.** 1982. The adaptative significance of amphiestomatic leaves. Plant Cell and Environment (5): 455-460.
- Mudge, K.W.** 1988. Effect of Ethylene on rooting. En: Davis T.A., B. Haissing, N. Sankhla. (ed.) Adventitious root formation in cutting. Portland, Oregon: Discordes Press.
- Neil, S.J., R. Desikan y J.T. Hancock.** 2002. Hydrogen peroxide signaling. Current Opinion in Plant Biology (5): 501-512.

- Ohkuma, K., F.T. Addicott, O.E. Smith y W.E. Thiessen.** 1965. The structure of abscisin II. Tetrahedron Letters, 29: 2529. Citado por: Devlin, R.M. 1980. Fisiología vegetal. 3ªEd. Barcelona: Omega, S.A. 517 pp.
- Oliveira, M., M.J. Leandro y E. Figueiredo.** 2012. Factors affecting the success of the rooting process in some Proteaceae. Acta Horticulturae (937): 817-824.
- Paiva, E.A.S., y S.R. Machado.** 2003. Collenchyma in *Panicum maximum* (Poaceae): localization and possible role. Australian Journal of Botany (51): 69-73.
- Paniagua, R.** 2007. Citología e histología vegetal y animal: biología de las células y tejidos animales y vegetales. 4ª Ed., Vol. II. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. 600 pp.
- Parkhurst, D.F.** 1978. The adaptive significance of stomatal occurrence on one of both surfaces of leaves. Journal of Ecology (66): 367-383.
- Parvin, P. E.** 1982. Propagation. Proc. 8th and 9th Annual Protea Wkshp. College of Trop. Agric. And Human Resources. University of Hawaii. Research Extension Series 018:19.
- Parvin, P.E., R.A. Criley y R.M. Bullock.** 1973. Proteas: development for a new cut flowers crop. HortScience 8 (4): 229-303.
- Pérez Francés J.F., M.N. Melián Capote y J.A. Rodríguez Pérez.** 2001. An anatomical study of adventitious root development in wounded cutting of *Leucadendron discolor* and *Leucadendron* 'Safari Sunset'. Acta Horticulturae (545): 191-194.
- Potikha, T.S., C.C. Collins, D.I. Johnson, D.P. Delmer y A. Levine.** 1999. The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. Plant Physicologic (119): 849-858.
- Rocas, G., C.F. Barros y F.R. Serrano.** 1997. Leaf anatomy plasticity of *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae) under distinct light regimes in a Brazilian montane Atlantic rain forest. Trees structure and Function 11(8): 469-473.
- Rodríguez Pérez, J.A.** 1990. A technique to improve the propagation of stem cutting of *Protea obtusifolia* Buek ex Meisn. Acta Horticulturae (264): 41-43.
- Rodríguez Pérez, J.A.** 1992. Propagation by leaf bud cutting of *Leucadendron* 'Safari Sunset', *Leucospermum cordifolium*, *Leucospermum patersonii* y *Protea obtusifolia*. Acta Horticulturae (316): 35-45.

- Rodríguez Pérez, J.A.** 1993. Introducción al cultivo de las proteas. Hortofruticultura (10):25-42.
- Rodríguez Pérez, J.A.** 1998. Cultivo de las proteas sudafricanas (II). Plantflor (4): 68-71.
- Rodríguez Pérez, J.A.** 2007. El cultivo de Proteas Sudafricanas y su desarrollo en Canarias. Santa Cruz de Tenerife: Turquesa Ediciones. 123 pp.
- Rodríguez Pérez, J.A., A.M. de León Hernández, M.C. Vera Batista, I. Rodríguez Hernández y H. Rodríguez Hernández.** 2014. The effect of cutting position, wounding and IBA on the rooting of *Leucospermum* 'Spider'. Acta Horticulturae (1031):77-81.
- Rodríguez Pérez, J.A., M.C. Vera Batista, A.M. de León Hernández y I. Rodríguez Hernández.** 2009. Vegetative cutting propagation of *Protea* Hybrid 'Susara'. European Journal of Horticultural Science 74 (4):175-179.
- Rodríguez Pérez, J.A., M.C. Vera Batista, A.M. de León Hernández y I. Rodríguez Hernández.** 2011. Use of proleptic shoots in the cutting propagation of *Protea* 'Susara' (Proteaceae). Spanish Journal of Agricultural Reseach 9 (2): 565-569.
- Rodríguez Pérez, J.A., M.C. Vera, A.M. de León y M.B. González.** 1993. Efecto del lesionado sobre la propagación por estaca de tallo de *Leucadendron* 'Safari Sunset' (Proteaceae). Actas de Horticultura (9): 578-580.
- Rohrbach, K.** 1984. A survey of diseases of Proteaceae in Hawai. En: Mathews, P. (ed.) The growing and marketing of proteas. Vol. II. Australia, Melbourne: Proteaflora Enterprises Pty Ltd. pp 29-28.
- Rossatto, D.R., R.M Kolb y A.C. Franco.** 2015. Leaf anatomy is associated with the type of growth form in Neotropical savanna plants. Botany 93:1-12.
- Rosseau, G.G.** 1966. Proteas can be grafted. Farming in South Africa 42 (6): 53-55.
- Rourke, J.P.** 1972. Taxonomic studies of *Leucospermum* R. Br. Journal of South African Botany. Supplementary Volume N°8.
- Rugini, E., G. Di Francesco, M. Muganu, S. Astolfi y G. Caricato.** 1997. The effects of polyamines and hydrogen peroxide on root formation in olive and the role of polyamines as an early marker for rooting ability. Biology of root formation and development. Ed. Altam and Waisel. Plenum Press. New York.

- Rumbal, J.M.** 1977. Aspects of propagation hygiene. Proceeding International Plant Propagation Society 27:323-324.
- Sánchez De Lorenzo, J.M.** 2005. Flora ornamental Española: las plantas cultivadas en la España peninsular e insular. Papilionaceae-Proteaceae Ed., Vol. IV. Junta de Andalucía: Consejería de Agricultura y Pesca. 704 pp.
- Santana, T.** 2012. Efecto del lesionado, aplicación de hormonas (IBA) y condiciones ambientales sobre la propagación por estacas de tallo de *Leucospermum* 'Spider'. Trabajo Fin de Carrera. Director/es: Rodríguez Pérez, J.A. y A.M. De León. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria. Universidad de La Laguna.
- Schreiber, L. y G. Kerstiens.** 2006. Preface to surviving in a hostile environment: barrier properties of cuticles and peridermis. Journal of Experimental Botany 57(11): 2547-2552.
- Sebastiani, I. y R. Tognetti.** 2004. Growing season and hydrogen peroxide effects on root induction and development in *Olea europaea* L. (cvs 'Frantoio' and 'Gentile di Larino') cuttings. Scientia Horticulturae 100: 75-82.
- Seemann, P., R. Kramm, G. Awad, I. Ojeda y M.H. Vásquez.** 2013. Rooting responses of some Chilean Proteaceae with ornamental potential. Acta Horticulture 660: 426-435.
- Soteros, J.J.** 1987. New disease in *Leucospermum*. Journ. Of Int. Plant. Assoc 11:29-31.
- Soteros, J.J.** 1988. Leaf diseases. New Zealand Protea Growers Association Newsletter 17: 22-31.
- Spurr, A.R.** 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 26(1): 31-43.
- Steward, F.C.** 1963. The control of growth in plant cells. Scient 209: 104-13.
- Steward, F.C., M.O. Mapes, A. E. Kent y R.D. Holstein.** 1964. Growth and development of cultured plant cells. Scient 143: 20-27.
- Steward, F.C., M.O. Mapes, y K. Mears.** 1958. Growth and organized development of cultured cells. Organization in cultures grown from freely suspended cells. Am. J 45(2): 704-8.
- Steward, F.C., P.V. Ammirato y M.O. Mapes.** 1970. Growth and development of totipotent cells: some problems, procedures and perspectives. Ann (34): 761-87.

- Su, G.X., W.H. Zhang y Y.L. Liu.** 2006. Involvement of hydrogen peroxide generated by polyamine oxidative degradation in the development of lateral roots in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology* 48 (4):426-432.
- Suárez Toste, E.** 2015. Micropropagación de cultivares del género *Leucospermum* (Proteaceae). Tesis Doctoral. Director/es: Pérez Francés, J.F., M.C. Alfayate y J.A. Rodríguez Pérez. Sección de Biología de la Facultad de Ciencias. Universidad de La Laguna.
- Tehraniyar, A., S.M. Tabar, Y. Selahvarzi, A. Balandary y M. Kharrazi.** 2014. Biochemical changes in barberries during adventitious root formation: the role of indole-3-butyric acid and hydrogen peroxide. *Spanish Journal of Agricultural Research* 12 (2):477-485.
- Teixeira, G., A. Monteiro y C. Pepo.** 2008. Leaf morphoanatomy in *Hakea sericeae* and *H. salicifolia*. *Microsc. Microanal.* 14(3): 109-110.
- Torres, F.** 1998. Comparative foliar anatomy of South American Proteaceae. *Australian Journal of Botany* (46): 357-365.
- Tukey, H.B., F.W. Went, R.M. Muir y J. Van Overbeeck.** 1954. Nomenclature of chemical plant regulators. *Plant.* 28:67. Citado por: Devlin, R.M. 1980. *Fisiología vegetal*. 3ªEd. Barcelona: Omega, S.A. 517 pp.
- Tworokski, T. y F. Takeda.** 2007. Rooting response of shoot cuttings from three peach growth habits. *Scientia Horticulturae* (115): 98-100.
- Van der Heede, A.A.** 1981. *El estaquillado: guía práctica de multiplicación de las plantas*. Madrid: Mundi-Prensa. 197 pp.
- Van der Merwe E.K., D.C. De Swardt, J.F. Ferreira y G.J. Brits.** 1991. Evaluation of a *Leucospermum tottum* x *L. formosum* hybrid as *Phytophthora cinnamomi* tolerant rootstock. *Protea News* 11:15-17.
- Van der Merwe, P.** 1985. The genetic relationship between the South African Proteaceae [sic]. *Protea News* 3:3-5.
- Van Staden, J. y A.R. Harty.** 1988. Cytokines and adventitious rooting. En: Davis, T.A., B. Haissing, N. Sankla. (ed.) *Adventitious root formation in cuttings*. Portland, Oregon: Dioscoride Prees.
- Venkata Rao, C.V.** 1971. *Proteaceae*. Bet, Monogr. N°6. Council of Scientific and Industrial Research. New Delhi. India.

- Vera Batista, M.C.** 2016. Contribución al conocimiento de la propagación por estaca de algunas especies y cultivares de proteas. Tesis Doctoral. Director/es: Rodríguez Pérez, J.A., M.C. Alfayate y I. Frías. Escuela Politécnica Superior de Ingeniería (Sección de Ingeniería Agraria). Universidad de La Laguna.
- Vogts, M.M.** 1982. South African's Proteaceae. Know them and grow them. 1ª Ed. Cape Town. : C. Struik (Pty) Ltd. 240 pp.
- Von Broembsen, S.L.** 1986. Blight of pincushions (*Leucospermum spp.*) caused by *Drechslera dematoidea*. Plant Diseases 70:33-36.
- Worral, R.J.** 1976. Effects off time of collection, growing-conditions of mother plants and growth regulators on rooting of cutting of *Telopea speciosissima* (Proteaceae). Scientia Horticulturae (5):153-160.
- Zimmerman, P.W. y F. Wilcoxon.** 1935. Several chemical growth substances which cause initiation of roots and other responses in plants. Contributions from Boyce Thompson Institute (7): 209-229.

