

**“FACTORES BIOQUÍMICOS QUE CONTROLAN LA
RIZOGÉNESIS ADVENTICIA DE LA YERBA MATE (*Ilex
paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae)”**

JOSÉ RAMÓN TARRAGÓ

**Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad Nacional del
Nordeste, área Recursos Naturales**

Director: Ing. Agr. Luis A Mroginski

Codirector: Ing. Agr. (Dr.) Pedro A Sansberro

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

Facultad de Ciencias Agrarias

2020

Resumen

La yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) es una especie leñosa, dioica que se cultiva para la utilización de hojas y tallos jóvenes, con los cuales se prepara una infusión llamada mate, apreciada por sus propiedades estimulantes. Las plantaciones actuales provenientes de plantas de semillas presentan una gran heterogeneidad en relación a la productividad y homogeneidad del producto a cosecha y su condición de leñosa, con gran cantidad de sustancias fenólicas, hace dificultosa la propagación vegetativa. La hipótesis planteada fue que diferentes factores fisiológicos condicionan la expresión de la rizogénesis adventicia en la yerba mate, los que en forma aisladas o en sinergia con otros, determinarían el éxito del proceso morfogénico. Considerando esto, el objetivo general de la presente tesis fue determinar la influencia de los principales factores potenciales involucrados en la rizogénesis adventicia de micro- y macro-estacas de *Ilex paraguariensis*, su participación a lo largo de las fases de enraizamiento, las interrelaciones y las posibles utilidades para la construcción de protocolos de propagación.

Fue posible optimizar el enraizamiento *in vitro* mediante la determinación óptima de la concentración de sacarosa, boro y tiempo de duración de la etapa de inducción. La adición de boro dejó en evidencia su relevancia como determinante de proceso, tal vez debido al estar involucrado en la síntesis de los componentes de la pared celular. Un incremento de la concentración de boro durante la fase de inducción permitió obtener un incremento de 12 % de enraizamiento. La medición de las enzimas peroxidasas en la zona de enraizamiento, permitió la separación de las fases del enraizamiento y la determinación de la duración de las mismas, lo que fue corroborado por los estudios histológicos. En este sentido, la desdiferenciación tendría una duración que va del día 0 al 2 (no se observan cambios anatómicos), la iniciación sería alrededor del día 9, mientras que la diferenciación de los primordios se daría cerca del día 10-12 desde el inicio de la inducción. La rizogénesis adventicia de vástagos *in vitro* y de estaca plurinodales de yerba mate no presentan limitaciones físicas en el crecimiento del primordio de raíz aunque sí orígenes diferentes según se trate de vástagos *in vitro* (parénquima floemático) o estacas plurinodales (cambium vascular) y esta diferencia en orígenes, según distintos métodos de propagación y explantes (vástagos obtenidos *in vitro* o esquejes de ramas semi-leñosas) se debería a la capacidad de desdiferenciación de las células presentes en tejidos de distintas edades y su respuesta a la señal de auxina.

Los ensayos de enraizamiento convencional mediante macro estacas permitieron dilucidar aspectos relevantes para el éxito del mismo. En este sentido, se determinó el diámetro óptimo de las estacas, y que el cultivar, la condición de crecimiento en la cual crece la planta dadora (intensidad de radiación PAR), la inducción y el uso de un flavonoide como la Quercetina, tienen un efecto marcado en la respuesta al enraizamiento. La actividad de enzimas peroxidadas durante el curso del enraizamiento adventicio cambia según el tratamiento de inducción, y la adición de Quercetina y Quercetina más ácido indolbutírico (IBA) producen un aumento de la actividad y una mejora del sistema radical, probablemente como consecuencia de una mayor concentración de formas libres de hormonas auxínicas.

El contenido de fenoles en las plantas dadoras de estacas limita la respuesta a la rizogénesis, independientemente del genotipo o edad de la planta por propiciar la muerte oxidativa de los esquejes antes de que el proceso de rizogénesis tenga lugar. En este sentido las condiciones de crecimiento de las plantas dadoras de estacas bajo reducida radiación permite mejorar sustancialmente la tasa de enraizamiento y sobrevivencia de estacas como consecuencia de una reducción del contenido de fenoles totales de cual determinará una menor oxidación.

Si bien es conocido, en muchas especies leñosas, la disminución de la respuesta rizogénica en plantas adultas debido a la maduración y el cambio de fase, la respuesta al enraizamiento en individuos adultos de yerba mate no se correlacionaría con la edad sino con el cultivar lo cual nos permitió determinar cultivares contrastantes en lo referido a su capacidad de enraizamiento.

Un protocolo de propagación agámica de individuos adultos de yerba mate mediante enraizamiento convencional debería contemplar bajos niveles de radiación durante el crecimiento de las plantas dadoras de esquejes, estacas de diámetro pequeño (semi-leñosas), pre-tratamientos con Quercetina 500 μ molar por una hora, tratamientos inductivos con IBA 4000 ppm en solución alcohólica por 5 minutos, y genotipos con elevada capacidad de enraizamiento.

Abstract

The yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) is a woody dioic species cultivated for its leaves and young shoots, which are used to prepare an infusion with stimulating properties known as mate. Existing cultivations, originated from seeds, exhibit large heterogeneity regarding productivity and quality of the harvested material; moreover, their woody nature with a high phenolic content, hinders their vegetative propagation.

The proposed hypothesis was that several physiological factors condition the expression of adventitious rhizogenesis in yerba mate and that, acting alone or together with other factors, would determine the outcome of the morphogenic process. Considering this, the general objective of the thesis was to determine the influence of the main factors potentially involved in adventitious rhizogenesis of micro- and macro-cuttings of *Ilex paraguariensis*, their role along the rooting phases and their possible use to develop propagation protocols.

In vitro rooting was possible by determining the optimal sucrose and boron concentration as well as the length of the induction phase. Boron addition revealed its relevance for rooting induction, maybe due to its involvement in the synthesis of cell wall components. An increase in boron concentration during the induction phase allowed a 12% increase in rooting. Peroxidases measurement in the rooting zone made it possible to separate the rooting phases and their length, which was confirmed with histological studies. The dedifferentiation would take place from day 0 to day 2 where no anatomical changes are observed, root primordia initiation would occur around day 9 and primordia differentiation with a visible vascular connection would take place around days 10 to 12 from the start of the induction. Adventitious rhizogenesis from *in vitro* shoots and plurinodal cuttings of yerba mate has no physical limitation for root primordia growth even when their origins are different: phloematic parenchyma for *in vitro* shoots and vascular cambium for cuttings. This origin difference would be due to the dedifferentiation ability of cells from tissues of different age and to their response to the auxin signal.

Conventional rooting assays using macro-cuttings made it possible to understand some aspects relevant for its success. In this sense, optimal diameter of cuttings was determined and it was observed that the cultivar, growth conditions of the mother plant (PAR radiation), induction and use of a flavonoid like quercetin have a marked effect in the rooting response. Peroxidases activity in adventitious rooting changes according to

the induction treatment, and the addition of quercetin and quercetin plus indole butyric acid (IBA) result in an increase in their activity and an improvement of the root system development, as a consequence of an increase in free auxin content. The phenolic compounds content of mother plants limits the rhizogenic response independently from the genotype or age of the plant, because it causes oxidation of the cuttings before the rooting takes place. Interestingly, the growth of mother plants under low radiation allows a substantial improvement of rooting rates and the survival of cuttings as a consequence of a reduced phenolic content and, therefore, less oxidation.

Even though it is known that there is a reduction in rooting rates as a result of aging and phase change in many woody species, the rooting response in adult plants of yerba mate would not be related to age but to cultivar, which lead us to the identification of contrasting cultivars regarding their ability to root.

An agamic propagation protocol from adult plants of yerba mate through conventional rooting should consider keeping mother plants under low radiation levels, cuttings with small diameter (semi-woody), 1-hour treatments with quercetin 500 μ molar, inductive treatments with IBA 400 ppm in alcoholic solution for 5 minutes, and the use of genotypes with high rooting ability.

Los experimentos llevados a cabo en esta tesis han sido realizados en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) y en el departamento de Básicas Agronómicas (Facultad de Ciencias Agrarias UNNE) con material vegetal provisto por las empresas yerbateras Las Marías S.A.C.I.F.A y La Cachuera S.A.

DIRECTOR DE TESIS

Ing. Agr. Luis A. Mroginski

CODIRECTOR DE TESIS

Ing. Agr. (Dr.) Pedro A. Sansberro

Dedicado a

A mi familia, Macarena, Emilio y Felipe que me supieron acompañar en todo momento resignando tiempo compartido.

A la memoria de mis padres Carmen y Francisco que supieron inculcarme el valor de la perseverancia.

Agradecimientos

Esta tesis fue posible gracias al apoyo de instituciones nacionales, empresas privadas y personas generosas que ayudaron de alguna u otra manera.

Al Ing. Agr. Luis Mroginski, mi director de tesis, quien me ha apoyado en todo momento y animado a la presentación de la misma.

Al Ing. Agr. (Dr.) Pedro Sansberro, mi codirector de tesis que con su tiempo y conocimiento me ha orientado en la realización de los experimentos y análisis de los mismos.

A la Universidad Nacional del Nordeste

Al CONICET

Al establecimiento La Cachuera S.A. y en especial al Ing. Agr. Ángel Fediuk quien me abrió las puertas del establecimiento La Negrita y con quien se seleccionó el material vegetal adulto a trabajar en esta tesis.

Al Establecimiento Las Marías S.A.C.I.F.A.

A la Cátedra de Fisiología Vegetal F.C.A UNNE y en especial a la Ing. Agr. (Dra.) Hebe Rey y al Ing. Agr. Eduardo Flaschland por su apoyo, ayuda y permanente estímulo.

Al Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) CONICET-UNNE y en especial a la Dra. Ana María Gonzalez por dedicar su tiempo en enseñarme técnicas de anatomía vegetal, ayuda en el análisis de los cortes realizados y preparación de las láminas ilustrativas.

A la Bioq. Mirta Faloci por asistirme y enseñarme técnicas de análisis de enzimas.

A la Ing. Maria Laura Fontana por su colaboración en el armado de las láminas.

Al Ing. Agr. Gabriel Pinto Ruiz por su ayuda en la edición del manuscrito.

A todas aquellas personas que de alguna manera u otra han colaborado de la realización de este trabajo de tesis

Trabajos publicados en el marco de esta Tesis

Effect of leaf retention and flavonoids on rooting of *Ilex paraguariensis* cuttings. Por: José Tarragó, Pedro Sansberro, Rosana Filip, Paula López, Ana María Gonzalez, Claudia Luna and Luis Mroginski. *Scientia Horticulturae* 103: 479-488. 2005.

Anatomical structure and secretion compounds of colleters in nine *Ilex* species (Aquifoliaceae) from southern South America. Por: Ana M. Gonzalez and José R. Tarragó. *Botanical Journal of the Linnean Society* 160:197-210. 2009.

Influence of the irradiance on phenols content and rooting of *Ilex paraguariensis* cuttings collected from adult plants. Por: José Tarragó, Roxana Filip, Luis Mroginski and Pedro Sansberro. *Acta Physiologia Plantarum* 34:2419-2424. 2012.

Presentaciones a Congresos Internacionales

4º Congreso Sudamericano de la yerba mate. Realizado del 5 al 8 de noviembre de 2006 en Posadas Misiones.

Efecto del diámetro de la estaca sobre el enraizamiento adventicio de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). Por: Jose Tarragó, Pedro Sansberro, Claudia Luna, Luis Mroginski.

Presentaciones a Reuniones Científicas

Actas de la Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas SGCyT. UNNE. 2003.

“Determinación de enzimas peroxidasas en tejidos caulinares de *Ilex dumosa* R. e *Ilex paraguariensis* St. Hil”. Por Tarragó J; Faloci M; Luna C; Sansberro P; Mroginski L.

XXV Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Año 2004.

“Caracterización cinética e isoenzimática de peroxidasa en brotes de *Ilex dumosa* R. e *Ilex paraguariensis* St. Hil obtenidos por cultivo *in vitro* de segmentos nodales”. Por: Tarragó, J; Talano, M; Faloci, M; Luna, C; Sansberro, P; Mroginski, L.

Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas SGCyT. UNNE. 2004

“El empleo de soluciones alcohólicas de IBA promueve el enraizamiento adventicio de estacas plurinodales de yerba mate *Ilex paraguariensis* St. Hil”. Por: Tarragó, J; Luna, C; Sansberro, P; Mroginski, L.

XXXI Jornadas Argentinas de Botánica, Septiembre 2007. Boletín de Sociedad Argentina de Botánica

Determinación de las fases ontogénicas del enraizamiento *in vitro* de *Ilex paraguariensis*. St. Hil. Por: Tarragó, J; Sansberro, P; Gonzalez, A; Luna, C; Mroginski, L.

XIX° Reunión de comunicaciones científicas y técnicas y reunión de extensión. Facultad de Ciencias Agrarias. UNNE. 2008. Corrientes. Argentina

“Efecto del genotipo en la rizogénesis adventicia de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*)”. Tarragó José R; Skromeda Matias M; Baumgratz Gustavo R; Sansberro Pedro A; Mroginski Luis A.

Actas de la XXVII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Año 2008.

Actividad de enzimas peroxidasas durante la rizogénesis adventicia de estacas de yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil)”. Por: Tarragó José R.; Sansberro Pedro A.; Mroginski Luis A.

Abreviaturas y siglas

AIA	Ácido Indolacético
ANA	Ácido Naftalenacético
DO	Densidad Óptica
ϵ :	Coefficiente de extinción molar
FAA	Alcohol etílico 70°, formol, ácido acético, 90:5:5.
Ha	Hectárea
IBA	Ácido 3-Indol Butílico
l	Litro(s)
MS	Sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962).
MS ¼ diluido	Sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962), cuatro veces
mM	Milimolar
mg	Miligramo(s)
min	Minuto(s)
ml	Mililitro(s)
PAGE Electrophoresis)	Electroforesis en gel de poliacrilamida (Polyacrylamide Gel
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
POX	Enzimas peroxidasas
PPFD	Densidad de flujo de fotones fotosintéticos
PVP	Polivinilpirrolidona
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio (Sodium Dodecil Sulfate)
Tn	Toneladas
μ l	Microlitro(s)
μ M	Micromolar
V	Volts
% p/v	Porcentaje peso en volumen
% v/v	Porcentaje volumen en volumen

ÍNDICE

Resumen	i
Abstract	iii
Agradecimientos	vii
Trabajos publicados en el marco de esta Tesis	viii
Presentaciones a Congresos Internacionales	viii
Presentaciones a Reuniones Científicas.....	viii
Abreviaturas y siglas.....	x
ÍNDICE.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABLAS	xv
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL: INDUCCIÓN DE RAÍCES ADVENTICIAS EN ESTACAS CAULINARES COMO MÉTODO DE CLONACIÓN DE ESPECIES ARBÓREAS	1
Introducción	2
Formación de raíces adventicias	2
Aspectos fisiológicos relacionados con el enraizamiento adventicio.....	3
Importancia en el contexto productivo de la yerba mate	7
Antecedentes de investigación en la temática y planteamiento del problema.....	8
Hipótesis de trabajo	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos	11
CAPÍTULO II: ENRAIZAMIENTO ADVENTICIO DE MICRO-ESTACAS .	12
Introducción	13
Objetivo específico	17
Materiales y métodos	17
Resultados y discusión.....	20
Actividad de enzimas peroxidasas.....	25
Histología de enraizamiento adventicio <i>in vitro</i> en yerba mate.....	29
Separación de las fases del enraizamiento adventicio	30
Consideraciones finales del capítulo	32
CAPÍTULO III: ENRAIZAMIENTO POR MACRO-PROPAGACIÓN	34

Introducción	35
Objetivo específico	36
Materiales y métodos	37
Resultados y discusión.....	44
Consideraciones finales del capítulo	59
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES, CONSIDERACIONES FINALES Y	
PERSPECTIVAS FUTURAS	60
Conclusiones.....	61
Consideraciones finales	61
Perspectivas futuras	63
BIBLIOGRAFÍA	64

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Efecto de la variación del contenido de sacarosa durante el transcurso del proceso morfogénico en el porcentaje de estacas enraizadas (a), número de raíces neoformadas por micro-estaca (b) y crecimiento de las raíces resultantes (c). Las micro-estacas fueron cultivadas en un medio de inducción compuesto por MS1/4 adicionado con IBA 7,5 μ M durante 7 días y transferidas a un medio de diferenciación de igual composición nutritiva pero libre de fitohormonas. En todos los casos, la barra indica el promedio de tres repeticiones \pm el error estándar de la media. Tratamientos con letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). 21
- Figura 2.** Análisis de la interacción entre el contenido de sacarosa y el periodo de inducción del proceso morfogénico sobre la tasa de formación de raíces adventicias en micro-estacas de yerba mate cultivadas en MS1/4 adicionado con IBA 7,5 μ M y transferidas a un medio de diferenciación de igual composición sin fitohormonas hasta alcanzar 35 días de incubación. En todos los casos, la barra indica el promedio de tres repeticiones \pm el error estándar de la media. Tratamientos con letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). *t: Test de Student para datos no apareados ($p \leq 0,05$ para comparar las dos concentraciones de sacarosa en un mismo tiempo de inducción). 22
- Figura 3.** Respuestas de los explantes a diferentes tiempos de inducción. A) Tiempos de inducción a) 0; b) 1; c) 5; d) 7; e) 11; f) 13; g) 15; h) 17 días. La barra indica 5 mm. 23
- Figura 4.** Efecto del pH sobre la actividad específica de enzimas peroxidasas en a) Fracción soluble y b) Fracción iónicamente unida a la pared en extractos de hojas obtenidas in vitro de *Ilex paraguariensis*. Concentración de o-dianisidina 0,63 mM y de H₂O₂ 20 mM. Utilizándose 0,1 M de buffer acetato para el rango de pH de 3,5 a 5,5 y 0,1 M de buffer fosfato para el rango de 6 a 7,5. 26
- Figura 5.** Curva de saturación de sustrato (H₂O₂) para la fracción de enzimas peroxidasas solubles extraídas de tejido foliar de vástagos puestos a enraizar in vitro a). U: Actividad específica expresada en $\text{mmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} / \text{mg} \text{ proteína} \cdot \text{ml}^{-1}$. b) Lineweaver-Burk. 28
- Figura 6.** Zimogramas de POXs aniónicas y catiónicas correspondientes a las fracciones solubles (S) y iónicamente unidas a la pared (I). 28
- Figura 7.** Evolución de la actividad de enzimas peroxidasas a lo largo de período de inducción del enraizamiento adventicio de micro-estacas de yerba mate cultivadas en MS1/4 50 g \cdot l⁻¹ adicionado con IBA 7,5 μ M. En todos los casos, la barra indica el promedio de tres repeticiones \pm el error estándar de la media. La línea punteada representa la curva de ajuste utilizando un polinomio de tercer orden. 29
- Figura 8.** Histología del enraizamiento *in vitro*: Secciones transversales del tallo en diferentes días de cultivo. (A) día 1; (B-C) día 5; C. igual a B, pero con luz polarizada para mostrar elementos lignificados como las fibras y elementos traqueales; (D) diferenciación del primordio en el día 6; (E) zona vascular mostrando numerosas divisiones celulares, nótese las paredes recién formadas en las células indicadas por las flechas; (F-G) Emergencia de las raíces adventicias al día 15; (I) Áreas mesistemáticas en la circunferencia del tallo; (J-L) Emergencia de las raíces. Abreviaturas: fc: fibras corticales; pr: primordio radical; x: xilema; c: córtex; e: epidermis; fx: fibras xilemáticas; m: médula; tc: tubos cribosos; zv: zona vascular. Flechas indican células con figuras mitóticas. Escalas: D: 50 μ m, todas las restantes 0,1 mm. 31

Figura 9. Cámara de enraizamiento donde se realizaron la incubación de las estacas. A) Vista exterior de la cámara B) Vista interior de la cámara con las estacas de uno de los experimentos realizados.....	38
Figura 10. Modificación del contenido de fenoles totales en brotes de yerba mate mediante el crecimiento de plantas bajo diferentes niveles de radiación. A) Esquema general del experimento en sus dos etapas (en macetas bajo diferentes niveles de radiación y a campo en plantas adultas. B) Vista panorámica de la distribución de los tratamientos de diferentes niveles de sombreados. C; D; E y F corresponden a 100, 15, 3 y 1,5 % de PPF.	40
Figura 11. Efecto que ejerce el diámetro de la estaca sobre le supervivencia (A) y ulterior rizogénesis adventicia (B) de la misma. En todos los casos, la barra indica el error estándar de la media (SEM). Letras distintas indican diferencias significativas (test de Duncan, $p \leq 0,05$).	44
Figura 12. Vista de las estacas enraizadas a los 35 días de iniciado el experimento. Estacas con distintos diámetros A) menor a 3 mm; B) entre 3 y 5 mm; C) mayor a 5 mm. Las barras indican 1 cm.....	45
Figura 13. Efecto que ejerce el diámetro de la estaca sobre el peso seco de raíces y brotes. En todos los casos, la barra indica el error estándar de la media (SEM). Letras distintas indican diferencias significativas (test de Duncan, $p \leq 0,05$).	46
Figura 14. Plantas de <i>I. paraguariensis</i> creciendo bajo diferentes niveles de radiación. A) 100, B) 15; C) 3 y D) 1,5 % de PPF. La barra indica 5 cm.....	47
Figura 15. Influencia de la irradiancia PAR (PPFD) en el total de fenoles solubles, oxidación y enraizamiento de esquejes obtenidas de plantas que crecían en macetas.	48
Figura 16. Respuesta al enraizamiento adventicio y su relación con el contenido de fenoles totales en esquejes extraídos del interior de canopeo (azul) o del exterior del canopeo (rojo) para el enraizamiento de otoño (A); primavera (B); y verano (C). El contenido de fenoles totales esta expresado en equivalente de ácido gálico por mg de hoja.....	52
Figura 17. Estacas enraizadas de los clones V-16 (arriba) SI 49 (abajo), extraídos del exterior (A; C) y del interior (B; D) del canopeo. La barra indica 1 cm.	53
Figura 18. Respuestas obtenidas de la interacción de auxina flavonoide en el enraizamiento de estacas de yerba mate A) Enraizamiento en %, B) Número promedio de raíces por estaca C) Longitud de raíces promedios D) Número de estacas con raíces secundarias.	56
Figura 19. Respuestas de distintos tipos de inducción a las 35 de días. A) Tratamiento control; B) Quercetina y C) Quercetina más IBA. La barra indica 5 cm.	57
Figura 20. Efecto de la actividad peroxidasa en el curso del enraizamiento adventicio de estacas de yerba mate con distintos tratamientos inductivos. Las líneas punteadas representan la curva de ajuste utilizando un polinomio de tercer orden.	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Análisis de la influencia del contenido de boro sobre el porcentaje de estacas enraizadas y el número de raíces neoformadas por micro-estacas de yerba mate cultivadas en MS1/4 adicionado con IBA 7,5 μ M y transferidas a un medio de diferenciación de igual composición sin fitohormonas hasta alcanzar 35 días de incubación. Tratamientos con letras distintas indican diferencias significativas (Test de Duncan $p \leq 0,05$).	24
Tabla 2 Características del germoplasma y condiciones del canopeo utilizado en el ensayo de contenido de fenoles en hojas y su relación en el enraizamiento. Nota: la edad corresponde a los años desde la implantación hasta la fecha de colección del material.	41
Tabla 3 Efecto del cultivar, edad de plantación, posición de la brotación y contenido de sustancias fenólicas solubles en la respuesta a la oxidación y enraizamiento de estacas de <i>Ilex paraguariensis</i> extraídas del campo.	51
Tabla 4 Efecto del cultivar, estructura del canopeo, posición del brote y sus interacciones con el contenido de fenoles en hojas de <i>Ilex paraguariensis</i> en el segundo flash de crecimiento.	54

**CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL:
INDUCCIÓN DE RAÍCES ADVENTICIAS EN
ESTACAS CAULINARES COMO MÉTODO DE
CLONACIÓN DE ESPECIES ARBÓREAS**

Introducción

La propagación vegetativa de especies arbóreas con fines maderables, industriales, ornamentales o ecológicos mediante el enraizamiento de estacas caulinares, constituye una alternativa válida para sortear problemas asociados con viabilidad, germinación y almacenaje de semillas, superar estados de dormición, conservar genotipos que presenten caracteres superiores y contribuir a la uniformidad genética de una plantación. Este procedimiento de clonación puede ser adaptado fácilmente a muchas especies, genotipos o cultivares, posibilitando la propagación vegetativa de individuos élites con caracteres superiores de calidad de madera, tolerancia a enfermedades y/o plagas, en el contexto de un programa de mejoramiento genético; brindando a la vez, la posibilidad de obtener una considerable ganancia genética en un corto tiempo (Ritchie 1994; Davies *et al.* 2017).

Muchas especies arbóreas que revisten importancia económica y/o ecológica presentan una reducida o nula capacidad para formar raíces adventicias considerándose “recalcitrantes” al procedimiento de clonación por enraizamiento de estacas. Esto generalmente ocurre en algunas especies de fresnos, olmos, nogal, e inclusive, yerba mate. En cambio, en otras especies tales como pinos y álamos, la neoformación de raíces adventicias no presenta mayores dificultades (Pijut *et al.* 2011). En estos casos, sin embargo, pueden suceder, problemas asociados con la estructura del sistema radical tales como falta de raíces secundarias, tendencia a una orientación horizontal (plagiotropía), reducido número de raíces o pobre distribución en el contorno de la estaca lo cual limitan la adopción de este técnica de clonación.

Formación de raíces adventicias

El proceso de formación de raíces adventicias se diferencia de la formación de raíces laterales debido a que éstas se originan a partir de órganos aéreos o partes aisladas de la planta tales como brotes y/o tallos; mientras que el desarrollo de las raíces laterales o secundarias, se desarrolla siguiendo un patrón estructural característico a partir de la raíz pivotante del árbol (Esau 1977; Bellini *et al.* 2014).

El mecanismo por el cual se induce o se regula la iniciación y desarrollo de las raíces adventicias en las especies leñosas es un proceso genético y fisiológico afectado por el ambiente, aún no del todo esclarecido. Se origina a partir de células parenquimáticas próximas a los haces vasculares revistiendo cierta similitud con la

generación de raíces laterales (Esau 1977; Steffens y Rasmussen 2016). En este contexto, De Klerk y colaboradores (1999), establecieron que, al menos en manzano, este proceso morfogénico ocurre en tres fases sucesivas que determinan la aparición de las raíces en la superficie de las estacas. En la fase de des-diferenciación las células parenquimáticas se activan tornándose “competentes” al ser estimuladas por la acción de auxinas y otros metabolitos secundarios relacionados con la lesión tisular ocasionada al momento de preparar la estaca. En la siguiente fase de iniciación se advierte la formación del primordio radical resultante de divisiones celulares en diversos planos (anticlinales y periclinales). Finalmente, sobreviene la fase de diferenciación donde la señal hormonal ya no es requerida y el primordio de raíz prosigue su crecimiento y desarrollo, se produce la conexión vascular al cilindro central y se forma una raíz que emerge a través de la epidermis.

La formación de raíces adventicias puede originarse a partir de primordios radicales preformados que se encuentran latentes en la estructura del tallo como sucede en sauces y álamos; o bien, por acción antrópica mediante la estimulación por lesión y aplicación hormonal (Hartmann *et al.* 2002; Gonin *et al.* 2019). Este último (lesión tisular y aplicación de hormonas), constituye el principal modo de formación de raíces adventicias en la mayoría de las especies arbóreas. Una vez que la rama es extraída de la planta se originan una serie de respuestas a la lesión producida que podrían concatenarse en la formación *de novo* de un sistema radical adventicio. Sin embargo, la pérdida de la capacidad morfogénica asociada a la edad del individuo es uno de los factores principales que limitan la propagación vegetativa de muchas especies leñosas (Pijut *et al.* 2011) y determina la necesidad de realizar un estudio pormenorizado de los factores internos y externos involucrados.

Aspectos fisiológicos relacionados con el enraizamiento adventicio

La aplicación exógena de una auxina y la existencia de un tejido competente para iniciar el proceso rizogénico constituyen los componentes indispensables que determinan la neoformación de raíces adventicias (Haissig *et al.* 1992; De Klerk *et al.* 1999). En este escenario, los factores endógenos (reguladores del crecimiento, radicales libres, antioxidantes, macro y micro elementos, entre otros) y ambientales (intensidad lumínica y calidad espectral, oxígeno, dióxido de carbono, humedad relativa, composición y pH del substrato, etc.) que afectan el proceso morfogénico también

influyen en el crecimiento de la planta. Sin embargo, el papel biológico que tendrían estos factores en el proceso rizogénico permanece aún poco entendido, siendo la explicación más simplista la interacción de tales factores determinando la promoción o inhibición de la actividad hormonal y/o rejuvenecimiento del tallo.

Los factores internos, mencionados anteriormente, están regulados a su vez por el estado de maduración de la planta dadora de esquejes o estacas y también de la posición en la que se encuentra en la planta (topófisis) (Steffens y Rasmussen 2016).

Durante el desarrollo, muchas las plantas sufren cambios fenotípicos que forman parte de un proceso ontogénico conocido como “maduración”, el cual, puede ser dividido en tres fases: vegetativa juvenil, vegetativa madura y reproductiva. En este sentido, la maduración se refiere a un proceso continuo que resulta en cambios estables en el desarrollo, produciendo una disminución de la tasa de crecimiento, incremento de la frecuencia en el desarrollo reproductivo, y una alteración en las características morfológicas (Greenwood *et al.* 1989). Al proceso de maduración también se lo conoce como cambio de fase (Olesen 1978; Greenwood 1995), envejecimiento, envejecimiento ontogénico (Olesen 1978; Greenwood 1995), ontogenia, ciclófisis y envejecimiento meristemático (Olesen 1978), llamados así por estar localizado en el meristema, y por lo cual las especies arbóreas pueden tener distintos niveles de maduración (Wendling *et al.* 2014a).

La visualización más evidente del proceso de “maduración” es el pasaje de la fase juvenil, a la fase reproductiva con la aparición de las flores, y como se describió Hackett 1987 anteriormente, este cambio de fase produce modificaciones fenotípicas y también una marcada disminución de la capacidad de enraizamiento (Poethig 1990; Wendling *et al.* 2014a). En este sentido, y particularmente en especies leñosas, el incremento en la edad del genotipo a propagar es un factor que frecuentemente limita la posibilidad del enraizamiento adventicio (Pizarro y Díaz-Sala 2019; Battista *et al.* 2019).

La topófisis en cambio, se refiere al efecto posicional del explante o estaca en la planta dadora, el cual condicionará en una interacción con la ciclófisis, la respuesta al enraizamiento adventicio y el subsecuente crecimiento o desarrollo de las plantas obtenidas (Hung y Trueman 2011; Wendling *et al.* 2014a). Normalmente en especies leñosas, y como consecuencia de las variaciones del crecimiento de la planta en las distintas posiciones (topófisis), las estacas proveniente de la parte basal e interior pueden retener mayores características juveniles que las estacas extraídas de la porción terminal

y exterior lo que posibilita al material contar con mayor características juveniles y mayor probabilidad de enraizamiento (Pijut *et al.* 2011; Rasmussen *et al.* 2019).

Un estudio comparativo realizado con un mismo genotipo de *Castanea sativa* demostró que en ausencia de diferencias anatómicas entre tejidos caulinares provenientes de estacas extraídas de ramas jóvenes y adultas, la división celular en respuesta a la auxina exógena ocurre en ambos tejidos; sin embargo, la organización del meristema es inhibido en el tejido adulto (Ballester *et al.* 1999). En otras palabras, el tejido logra retener la capacidad de división celular pero no la des-diferenciación seguida por la ocurrencia de re-diferenciación. Curiosamente, la fase de maduración de plantas enteras puede ser revertida a la fase juvenil mediante el uso de técnicas de revigorización (por ej. cascada serial de injertos sobre pies juveniles) capaces de restablecer la capacidad de formar raíces (Huang *et al.* 1992; Wendling 2014b); no obstante, las modificaciones celulares y bioquímicas que ocurren durante el cambio de fases y cómo estos efectos “reprograman” los eventos moleculares que conducen a la inhibición del proceso rizogénico en tejidos maduros es aún desconocido, prevaleciendo la hipótesis de que los cambios de maduración se originan por variación en el grado de metilación del ADN (Bellini *et al.* 2014). Asimismo, el cambio de fases podría estar regulado por cambios epigenéticos como los observados en mutantes de *Arabidopsis thaliana* que mostraron alteraciones en la síntesis de ARN de cadenas cortas (Willmann y Poethig 2005). La transición entre la fase juvenil y adulta podría estar regulada por miR156 (Wu y Poethig 2006), un microARN que controla un factor de transcripción miR156 necesario y suficiente para la expresión de la fase juvenil y regula el tiempo de la transición a la fase adulta (Wu *et al.* 2009).

De los factores endógenos mencionados, las hormonas constituyen los moduladores más importantes del desarrollo radical (Pop *et al.* 2011). Las auxinas están involucradas en muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las raíces de liliópsidas (monocotiledóneas) y magnoliópsidas (dicotiledóneas) (Gonin *et al.* 2019). Asimismo, su transporte endógeno polar es requerido para la inducción del proceso morfogénico en hipocótilos y tallos de muchas especies (Da Costa *et al.* 2013). A pesar de que el ácido indol-acético (AIA) es la auxina natural más abundante y la primera utilizada para inducir rizogénesis en estacas de tallos, no es empleada comúnmente en los protocolos de clonación, substituyéndose principalmente por el ácido indol-butírico (IBA) y en menor medida por el ácido naftalen-acético (ANA). El IBA es considerado el promotor

de enraizamiento más eficaz en muchas especies; sin embargo su conversión en AIA es un prerequisite para su activación (Strader y Bartel 2011). El nivel de auxinas activas en un momento dado dependerá del contenido de sus formas libres y conjugadas; siendo esta última una forma de inactivación reversible mediante la unión (conjugación) con ciertos aminoácidos, azúcares o inositol (Crozier *et al.* 2000). El exceso de las formas libres puede ser además regulado de manera irreversible (catabolismo) por descarboxilación oxidativa a través de la acción de enzimas peroxidasas (EC 1.11.1.7) u otras vías alternativas (Haissig *et al.* 1992; Gaspar, *et al.* 2002). La actividad de las auxinas implica la unión de éstas a una proteína receptora ABP1 (del inglés *Auxin Binding Protein*), dando lugar a una cascada de transducción (Dharmasiri y Estelle 2004). Se requieren niveles endógenos elevados de auxinas en la etapa temprana de inducción del enraizamiento debiendo disminuir su concentración a través de los mecanismos antes mencionados una vez que se alcanza la fase de diferenciación y crecimiento de la raíz. En el caso de que la auto-regulación se vea comprometida, la elevada concentración hormonal tendría efectos inhibitorios afectando negativamente el proceso (De Klerk *et al.* 1999). La eficacia de la hormona dependerá de la afinidad de ésta para unirse a la proteína del receptor, de la concentración de la forma libre que alcanza las células competentes del blanco, del nivel de auxinas endógenas y de su estabilidad metabólica (baja en AIA, intermedia en IBA y más alta en ANA). En el caso particular de la yerba mate, se dispone de información acerca de algunos factores que afectan el enraizamiento como el empleo de diversas auxinas, solas (Tschirsch 1979; Smichovski 1980; Cortezzi-Graca *et al.* 1988) o combinadas con ciertas sustancias antioxidantes (Caso y Dotta 1997; Tarragó 2001).

Por otra parte, es ampliamente aceptado el hecho de que las citocininas y giberelinas actúan de manera antagónica respecto a las auxinas durante la fase de inducción; sin embargo, una proporción adecuada de éstas resulta necesaria en la etapa de crecimiento o elongación de la raíz (Ricci *et al.* 2001). Otros compuestos que en ciertas situaciones mostraron un efecto promotor del enraizamiento adventicio incluyen a inhibidores de la síntesis de giberelinas, ácido abscísico, jasmonatos, poliaminas y brasinoesteroides que, al igual que las citocininas, podrían incrementar el número de raíces neoformadas (Haissig y Davis 1994).

La descripción de los factores que afectan la rizogénesis adventicia revela la compleja interacción de los mismos y pone en evidencia el hecho de que el desarrollo

radical y su respuesta a los cambios ambientales es controlado por una compleja red de regulación génica (Bellini *et al.* 2014). Con el propósito de identificar los genes que se expresan durante la etapa temprana del enraizamiento de *Pinus radiata* y *Castanea sativa* en respuesta a la aplicación de auxinas, Sánchez y colaboradores (2007) aislaron y caracterizaron dos transcritos que presentaron alta homología con el gen *SCARECROW*, factor de transcripción perteneciente al grupo de las proteínas GRAS, involucrado en el establecimiento del meristema radical en *Arabidopsis*. Más recientemente, la caracterización del gen *CsSCLI* y el análisis del patrón de su expresión diferencial en microestacas competentes y no competentes permitieron localizar al transcrito en las células involucradas en la iniciación del meristema radical en tallos competentes indicando el rol protagónico que tendría este gen en la fase de desdiferenciación y mantenimiento del meristema neoformado (Vielba *et al.* 2011).

Importancia en el contexto productivo de la yerba mate

En la República Argentina existen 212.083,59 Ha implantadas con yerba mate (<http://www.INYM.org.ar>), concentrándose la producción en las provincias de Misiones (90,2 %) y Corrientes (9,8 %). Las condiciones agroclimáticas de la región productora favorece el crecimiento y desarrollo de la especie posibilitando que nuestro país ocupe el primer lugar en la producción mundial de yerba mate. Por su parte, Brasil, caracterizado por un sistema de explotación extractivo de los montes nativos, posee 85.000 Ha implantadas; mientras que en Paraguay ésta alcanza a 35.000 Ha (Gortari 1997).

A pesar de que nuestro país aún mantiene su liderazgo como principal productor de este cultivo, la producción primaria presenta varios inconvenientes que requieren su atención en el mediano plazo a fin de conservar la sustentabilidad económica y social de la región productora. En tal sentido, la heterogeneidad de las plantaciones comerciales establecidas como el envejecimiento de los cultivos existentes limita la producción potencial del sistema y genera la necesidad de buscar soluciones tecnológicas que promuevan el crecimiento del sector. En este contexto, las plantaciones comerciales se establecen mediante el empleo de semillas provenientes de cruzamientos al azar y, debido a que la yerba mate es una especie dioica y su polinización es llevada a cabo por medio de insectos, existe una alta variabilidad genética en la descendencia, la cual trae el inconveniente de la heterogeneidad en las plantaciones resultantes, tanto

desde el punto de vista productivo como en la composición química y cualidades organolépticas del material obtenido. La variabilidad intra e inter-poblacional determinada por diferentes técnicas tales como análisis de isoenzimas (Winge *et al.* 1995; Wendt 2005), proteínas de almacenamiento en semillas (Gregianini y Winge 2000) y marcadores RAPD (Wendt *et al.* 2007) indican que, en general, la variabilidad es mayor dentro de una misma población.

Asimismo, la edad promedio avanzada que manifiesta gran parte de la superficie implantada, causa una disminución notable de la producción; siendo necesario su reemplazo por nuevas plantaciones que contemplen el uso de materiales genéticos homogéneos con caracteres superiores, capaces de manifestar su potencial productivo aún en condiciones adversas. En este sentido, fruto de más de 30 años de selección por fenotipo y productividad, realizada por INTA-EEA Cerro Azul y algunas empresas privadas del sector yerbatero, actualmente existen 14 cultivares de yerba mate inscriptos en el Instituto Nacional de Semillas (INASE). Sin embargo, la utilización comercial de los mismos es afectada por la carencia de un procedimiento de multiplicación vegetativa eficiente, que permita la obtención de plantas idénticas (“clonación”) en forma rápida y masiva.

Antecedentes de investigación en la temática y planteamiento del problema

Precedentemente se puso en evidencia que la habilidad que presenta un determinado individuo para originar raíces adventicias es afectada por diversos factores intrínsecos entre los que se pueden mencionar genotipo, edad, naturaleza del explante, posición de la estaca en la planta, entre otros. En tal sentido, estudios previos realizados en yerba mate brindaron información acerca de algunos aspectos fisiológicos y morfológicos relacionados tanto con la inducción del enraizamiento como con el número y distribución de las raíces regeneradas, determinándose que es imprescindible la permanencia de la lámina foliar en la estaca durante el proceso ontogenético (primeras cinco semanas de incubación) y que además, existe una fuerte correlación entre la posición de la hoja y la zona de regeneración de las raíces, originándose éstas en la base del explante y en forma lineal a la hoja remanente; con lo cual, al aumentar el número de hojas en la estaca, se logra una distribución uniforme en todo el contorno de la misma. Este hecho puso en evidencia que, desde el punto de vista anatómico, existiría una

conexión vascular entre la lámina foliar y el sitio de diferenciación celular, a través de la cual se translocarían algunas sustancias vinculadas al proceso. De igual modo, los resultados obtenidos demostraron por un lado, la existencia de una conexión vascular normal entre el primordio radical y el cilindro central de la estaca y, por el otro, a diferencia de lo que sucede en estacas plurinodales de *Ilex aquifolium* (Lovell y White 1986), la ausencia de impedimentos físicos de carácter tisular (presencia de esclerénquima, canales secretores, canales resinosos, etc.) que impidan la emergencia de las raíces neoformadas.

La propagación vegetativa constituye una herramienta importante para incrementar la competitividad del sector yerbatero y promover la industrialización de productos que brinden una infusión con características químicas y organolépticas definidas producidas a partir de genotipos adaptados a las condiciones ambientales imperantes en la zona de cultivo. Sin embargo, el método de enraizamiento de macro-estacas (estacas plurinodales) en la yerba mate presenta ciertas limitaciones que comprometen su adopción en escala comercial; por ejemplo, rápida pérdida de la capacidad de enraizamiento debido a la edad ontogénica, resultados contrastantes según los años y pobre desarrollo del sistema radical que, de manera conjunta, afectan negativamente la expresión génica de algunos cultivares.

En tal contexto, existen dos sistemas intensivos alternativos, micro- y mini-estacas, empleados exitosamente en la clonación masiva de *Eucalyptus* (Assis *et al.* 2004). Estos procedimientos revisten un alto potencial brindando una serie de ventajas técnicas y económicas respecto al método de macro-estacas; por ejemplo, mejoran el enraizamiento potencial, la velocidad del desarrollo rizogénico y la calidad del sistema radicular resultante. El sistema de micro-estacas utiliza brotes provenientes de la fase de multiplicación de la micropropagación y/o de la ulterior brotación de las vitroplantas resultantes; mientras que el método de mini-estacas está basado en el enraizamiento de brotes laterales extraídos de macro-estacas enraizadas. En ambos casos, las plantas madres son manejadas intensivamente para producir estacas pequeñas. Los huertos clonales en condiciones de cultivo comercial son reemplazados por mini-setos obtenidos por cultivos hidropónicos conducidos bajo condiciones ambientales estables que brindan propágulos vigorosos y con un estado nutricional adecuado. Sin embargo y a pesar de los esfuerzos realizados en las últimas décadas en pos de dilucidar los aspectos metabólicos que responden a diversos factores que afectan el proceso morfogénico, aún

son necesarios mayores estudios tendientes a esclarecer los procesos que delimitan las sucesivas etapas que lideran la formación de un nuevo sistema radicular en estacas caulinares.

En el caso específico de la yerba mate, existen antecedentes relacionados con el enraizamiento de micro-estacas que serán abordados en el capítulo correspondiente. A la vez, el Establecimiento Las Marías ha realizado los primeros ensayos con el uso de mini-estacas extraídas de plantas madres que crecían en condiciones hidropónicas con resultados promisorios (Ing. Ernesto García, comunicación personal). En la literatura existen numerosos estudios relacionados con distintos factores que afectan la rizogénesis adventicia en la yerba mate, pero éstos en general han sido abordados desde el punto de vista tecnológico sin profundizar los aspectos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que se concatenan en el proceso morfogénico.

Hipótesis de trabajo

Diferentes factores fisiológicos condicionan la expresión de la rizogénesis adventicia en la yerba mate, los que en forma aisladas o en sinergia con otros factores determinan el éxito del proceso morfogénético.

Objetivo general

Determinar la influencia de los principales factores potenciales involucrados en la expresión de la rizogénesis adventicia de micro- y macro-estacas de *Ilex paraguariensis*, su participación a lo largo de las fases de enraizamiento, las interrelaciones y las posibles utilidades para la construcción de protocolos de propagación.

Objetivos específicos

1. Delimitar las fases que se concatenan durante el proceso de enraizamiento *in vitro* de micro-estacas asociando factores bioquímicos y morfológicos.
2. Dilucidar los factores que controlan el enraizamiento de estacas de yerba mate, para la construcción de un protocolo de propagación convencional con altas tasas de enraizamiento.

El objetivo específico 1 se abordará en el capítulo II, mientras que el objetivo específico 2 será tratado en el capítulo III de esta tesis.

CAPÍTULO II: ENRAIZAMIENTO ADVENTICIO DE MICRO-ESTACAS

Introducción

El cultivo *in vitro* de segmentos nodales y ápices caulinares es utilizado en procedimientos de micropropagación de numerosas especies arbóreas, ya sea con fines de propagación o con el propósito de revertir los efectos negativos de la edad ontogénica del material que se desea propagar. Esta metodología permite estimular, a través de subcultivos sucesivos, la re-vigorización o rejuvenecimiento de partes adultas a fin de producir plantas con caracteres juveniles que brindarán un profuso sistema radicular capaz de soportar una brotación vegetativa activa (Díaz-Sala 2014). En este escenario, el proceso de rizogénesis adventicia constituye el tercer y último de los estados en que Murashige (1974) divide el procedimiento *in vitro* que conduce a la propagación de plantas, después del establecimiento y multiplicación de los explantes. El enraizamiento de los brotes provenientes de la fase de multiplicación es una parte importante de cualquier sistema de micropropagación. Éste puede llevarse a cabo en condiciones *in vitro* (Waldenmaier y Bünemann 1992; Díaz-Pérez *et al.* 1995; Bosa *et al.* 2003), o *ex vitro* en sistemas de niebla (Hatzilazaroua *et al.* 2006; Xu *et al.* 2008); como así también, mediante el empleo de una combinación de ambos ambientes (Welander 1983; Zimmerman y Fordham 1985).

Independientemente del sistema elegido, el enraizamiento adventicio incluye un proceso de desdiferenciación, en el cual, ciertas células preexistentes alteran su patrón morfogénico para actuar como células “madres” del primordio radical (Ermel *et al.* 2000). El proceso consta de tres fases fisiológicas sucesivas e interdependientes denominadas: desdiferenciación, iniciación y diferenciación (De Klerk *et al.* 1999), las cuales requieren de condiciones metabólicas determinadas y que son afectadas por numerosos factores intrínsecos y extrínsecos, tal como se explicó en el capítulo anterior.

Los nutrientes minerales tienen funciones esenciales y específicas en el metabolismo de las plantas: pueden funcionar como constituyentes de estructuras orgánicas, como activadores de reacciones enzimáticas, o como vehículos de carga y osmorreguladores (Marschner 1995). La nutrición es un factor clave que determina la morfogénesis de la raíz (Assis 2001) a través de los efectos en la formación de la raíz lateral y el control de la longitud y densidad de raíces formadas. Sin embargo, para comprender completamente la relación entre el enraizamiento adventicio y la nutrición mineral, necesitamos identificar él o los papeles de cada nutriente en cada fase del proceso de enraizamiento (Blazich 1988).

Si bien, para la optimización del enraizamiento adventicio, la nutrición debería ser completa, se han identificado la relevancia de algunos elementos minerales en la distintas etapas del proceso rizogénico a través de la alteración de distintos procesos bioquímicos o fisiológicos (De Almeida *et al.* 2017). En este sentido el calcio, nitrógeno, fosforo, potasio, magnesio, boro y el zinc, han sido identificados con elementos minerales relevantes en el proceso de rizogénesis adventicia.

El nitrógeno puede ser incorporado por sus formas de nitrato y amonio principalmente, aunque la forma de nitrato es la que principalmente se utiliza cuando se busca aumentar el enraizamiento ya que estimula la ramificación de la raíz, y actúa modelando la señal que determina el crecimiento y arquitectura, a través de proteínas sensores NPF y NRT2 (O'Brien, *et al.* 2016).

El calcio es requerido para la división celular, integridad de las membranas y también en el transporte de auxinas (Blazich 1988; Maathuis 2009).

La acción del potasio estaría relacionada a su función clave en la presión de turgencia y la regulación estomática, siendo importante para un enraizamiento exitoso ya que la pérdida de agua puede deshidratar el esqueje antes del desarrollo de la primera raíz, por lo que se necesita una concentración correcta de K. Las altas dosis de K han demostrado ser beneficiosas para el enraizamiento en *Eucalyptus dunni* (Oberschelp y Goncalves 2016).

El hierro y el manganeso promueven la actividad de enzimas peroxidasas específicas que degradan el AIA y por lo cual la disminución de estos dos elementos minerales durante la fase de inducción al enraizamiento de *Eucalyptus globulus* produce una mejora en el número de raíces (Schwambach *et al.* 2005)

Las funciones del boro en el metabolismo de las plantas está relacionada con la síntesis de la pared celular, la lignificación y la estructura de la pared celular (Hansch y Mendel 2009), los cuales son elementos importantes en el desarrollo de la raíz. La deficiencia de boro durante el proceso de rizogénesis adventicia resultó en una disminución de la tasa de enraizamiento en microestacas de *Eucalyptus globulus* (Schwambach *et al.* 2005). Estudios realizados en *Phaseolus aureus* han demostrado la necesidad del boro para el desarrollo del primordio de raíz en esquejes y este requerimiento es necesario en la primera fase del enraizamiento, lo que estaría indicando la posibilidad de que el boro regule los niveles endógenos de auxina durante el desarrollo en la primera fase del enraizamiento adventicio (Jarvis *et al.* 1983).

El zinc es requerido para la biosíntesis de triptófano, un importante precursor de auxinas (Blazich 1988). Una mayor concentración de zinc en la fase de inducción puede influir en la disponibilidad de auxina y la actividad de enzimas antioxidantes generalistas como las superóxido dismutasas de Cu-Zn (Alscher *et al.* 2002), favoreciendo la respuesta de enraizamiento; de hecho, “esto” se observó para microestacas de *Eucalyptus globulus*, que formaron más raíces cuando la concentración de Zn en el medio se elevó de 9 a 60 μM (Schwambach *et al.* 2005). Otra acción del zinc y en interacción con el Cu, Mn y Fe, es a través de la mitigación del estrés por oxidación ya que estos elementos minerales participan como constitutivos de numerosas enzimas del complejo antioxidante (Oberschelp y Goncalves 2016). El exceso de Zn puede producir inhibición en el enraizamiento de manera similar a los metales pesados no esenciales como el cadmio, lo que fue observado en *Populus alba* L. cv. Villafranca (Castiglione *et al.* 2007).

En muchos casos la adición de distintos elementos minerales, y en especial de microelementos, en las distintas fases del enraizamiento produce variadas respuestas ya que la provisión de los mismos en la etapa de crecimiento de las estacas suele ser suficiente para un adecuado enraizamiento (Brondani *et al.* 2014). Una nutrición mineral completa y bien equilibrada en las plantas dadoras de esquejes (un factor fácilmente controlable en los setos clonales), puede modular la sensibilidad y concentración hormonal que favorezcan el desarrollo de la raíz a un costo relativamente bajo.

Aunque el enraizamiento adventicio y la nutrición mineral están íntimamente relacionados, no existen estudios en yerba mate que intenten caracterizar los efectos de elementos minerales minerales específicos en cada una de las fases del proceso de enraizamiento.

Existen numerosos trabajos en la literatura que relacionan distintos factores con el enraizamiento *in vitro* de micro-estacas de varias especies del género *Ilex*. En este contexto, Rey y Mroginski (1988) informaron la posibilidad de obtener plantas enteras de *I. paraguariensis* mediante el pretratamiento de los brotes juveniles con una solución de ácido naftalenacético (ANA) y ulterior cultivo en un medio semisólido desprovisto de fitohormonas. Posteriormente, Sansberro y colaboradores (2000), informaron un procedimiento para inducir rizogénesis adventicia mediante el tratamiento de la base de las micro-estacas provenientes de plantas jóvenes y adultas de yerba mate con una solución sólida compuesta por ácido indolbutírico (IBA) y 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-

5-ona (PPZ) disuelta en talco inerte y cultivadas en vermiculita estéril impregnada con una solución nutritiva de composición química definida. Del mismo modo, utilizando un tratamiento de inducción con IBA, ha sido posible estimular el proceso de rizogénesis adventicias en otras especies cogenéricas tales como *I. aquifolium* (Majada *et al.* 2000), *I. argentina*, *I. brevicuspis*, *I. microdonta*, *I. taubertiana*, *I. theezans* (Sansberro *et al.* 2001), *I. dumosa* (Luna *et al.* 2003), *I. cymosa* (Awang *et al.* 2009), *I. glabra* (Sun *et al.* 2010), *I. khasiana* (Dang *et al.* 2011), *I. crenata* (Sun y Gao 2013). Por otra parte, Horbach (2008) desarrolló un procedimiento de clonación basado en el enraizamiento *in vitro* de micro-estacas de *I. paraguariensis* y ulterior escalado de la producción a partir del enraizamiento de mini-estacas extraídas de vitro-plantas que crecían en condiciones de invernadero, utilizando en ambos casos un tratamiento con IBA como inductor del proceso morfogénico.

El uso generalizado de auxinas como inductor del proceso morfogénico confirma el rol protagónico que la actividad de tales sustancias tendrían en el enraizamiento adventicio (Nemeth 1986). Si bien, las estacas caulinares generalmente responden a la adición exógena de auxinas, la respuesta es dependiente del genotipo, edad ontogénica, tipo de auxina, momento y duración de la aplicación (Moncousin 1991). Estudios precedentes demostraron tempranamente la existencia de una correlación entre el contenido de auxinas libres en la zona basal de la estaca y la neoformación de raíces adventicias (Berthon *et al.* 1989). El control del nivel endógeno de auxinas libres está dado por la actividad de enzimas peroxidasas (POX) en el tejido (Gaspar *et al.* 1982) por lo que la adición de sustancias capaces de inhibir o estimular la actividad enzimática durante una de las fases que componen el proceso tendrá un impacto directo sobre el mismo (Moncousin y Gaspar 1983). La progresiva acumulación de auxinas en la zona basal es un pre-requisito para generar el pico de concentración necesario para iniciar el proceso rizogénico (Acosta *et al.* 2009); sin embargo, algunos estudios indican que el transporte basípeto puede ser regulado negativamente por estrigolactonas (Rasmussen *et al.* 2012) revelando que la organogénesis sería la resultante de una compleja interacción entre varias fitohormonas (Da Costa *et al.* 2013).

Del mismo modo, los carbohidratos contribuyen a la formación de raíces adventicias actuando como regulador osmótico y suministrando energía y carbono necesario para la división celular, establecimiento del nuevo meristema radical y formación de la raíz (Druege 2009; Yaseen *et al.* 2013).

Objetivo específico

Delimitar las fases que se concatenan durante el proceso de enraizamiento *in vitro* de micro-estacas asociando factores bioquímicos y morfológicos.

1. Analizar el efecto que ejerce la interacción de IBA con carbohidratos y boro sobre la formación de raíces adventicias.
2. Determinar la actividad de enzimas peroxidasas en el curso del enraizamiento adventicio.
3. Realizar el análisis ontogénico del primordio radical.

Materiales y métodos

Material vegetal

Los explantes utilizados fueron segmentos nodales de 1,5-2 cm de longitud conteniendo una yema axilar, que fueron extraídos de la porción media ramas jóvenes, no lignificadas, provenientes de plantas de yerba mate juveniles (no más de 4 años de edad) y adultas (origen clonal) que crecían en macetas de 4 litros de capacidad bajo condiciones de invernadero. Los explantes fueron lavados superficialmente con una solución de etanol 70 % durante 1 min, transferidos a una solución acuosa de NaOCl (1,5 %) adicionada con TRITON[®] durante 30 min y finalmente enjuagados tres veces con agua destilada estéril. Seguidamente, éstos fueron cultivados en tubos de vidrio de 11 ml de capacidad (1 explante por tubo) conteniendo 3 ml del medio basal de Murashige y Skoog (1962) diluido cuatro veces ($MS\frac{1}{4}$) y adicionado con sacarosa 90 mM. El pH de la solución fue ajustado a 5,8 antes de la adición del agente gelificante (agar SIGMA[®] A-1296, 0,65 %). Los medios de cultivo fueron esterilizados mediante exposición en autoclave ($1,45\text{ kg}\cdot\text{cm}^{-1}$) durante 20 minutos.

Los cultivos fueron incubados en condiciones de luz (fotoperíodo 14 h, $116\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, luz PAR) y temperatura controlada ($27\pm 2\ ^\circ\text{C}$). Al cabo de 35 días de incubación, los brotes con más de 5 mm de longitud sin síntomas de contaminación visibles fueron seleccionados con fines de experimentación.

Analizar el efecto que ejerce la interacción de IBA con carbohidratos y boro sobre la formación de raíces adventicias.

Se realizó un experimento preliminar con el propósito de establecer la concentración óptima de sacarosa (30, 90, 150 y 200 mM) en las fases de inducción y expresión del enraizamiento *in vitro*. A tal fin, las micro-estacas fueron cultivadas en un medio de inducción semisólido (Phytigel 3,5 g·L⁻¹) compuesto por MS¼ adicionado con IBA 7,5 µM durante 7 días y transferidas a un medio de diferenciación de igual composición pero libre de fitohormonas hasta los 35 días de iniciado el ensayo.

Finalmente, se realizó un segundo experimento a fin de analizar el efecto que tendría el boro (B) sobre el proceso morfogénico, suplementando al medio basal semisólido con H₃BO₃ a fin de establecer una concentración final del elemento B entre 0 y 10 µM, efectuándose un experimento factorial entre las fases de inducción y diferenciación. En este caso, el medio de inducción fue adicionado con sacarosa 30 mM, incrementando la misma a 90 mM durante la fase de diferenciación.

Determinar la actividad de enzimas peroxidasas.

Se prepararon extractos enzimáticos homogeneizando 1 g de tejido vegetal fresco en 1 ml de buffer Acetato de sodio/ácido acético 0,2 M, pH 4,2 con PVP al 5 % P/V y posterior centrifugación a 1.000 g por 10 min. La fracción soluble (s) correspondió al sobrenadante. Las POX iónicamente unidas a pared (i) fueron obtenidas luego de tratamiento del pellet con igual buffer suplementado con 1M ClNa por 2 horas en agitación a 28°C. El sobrenadante obtenido por centrifugación a 2.500 g por 10 min correspondió a la fracción iónicamente unida a la pared. El contenido de proteína se determinó por el método de Bradford (1976) usando albúmina sérica bovina como estándar. La actividad peroxidasa se midió en una mezcla de reacción compuesta por: 15 µl de extracto enzimático, o-dianisidina 0,63 mM, H₂O₂ 35 mM, buffer acetato 100 mM, en un rango de pH de 3,5 a 5,5 y buffer fosfato 100 mM, en un rango de pH de 6 a 7,5. La actividad enzimática se determinó por la aparición del producto de oxidación de o-dianisidina por los cambios de absorbancia a 470 nm y a 35° C ($\epsilon=11,3 \text{ mM}^{-1}$). La curva de saturación de sustrato se realizó con concentraciones crecientes de H₂O₂ (5, 10, 25, 45 mM), a partir de la fracción soluble y manteniendo constante la de o-dianisidina (0,63 mM).

La electroforesis catiónica se efectuó en geles de poliacrilamida no desnaturalizante, siguiendo el protocolo desarrollado por Laemmli (1970); mientras que la electroforesis aniónica se realizó empleando el procedimiento descrito por Reisfeld *et al.* (1962). Finalmente los geles fueron revelados empleando bencidina siguiendo las pautas establecidas por Milrad de Forchetti y Tigier (1990).

Estudios anatómicos de la rizogénesis adventicia.

Para los estudios anatómicos se tomaron muestras de material usado como explante (segmento inferior de los vástagos) en forma diaria desde el inicio de la inducción y hasta la aparición de las raíces, los que se fijaron en FAA (alcohol, formol, ácido acético, 90:5:5). Para las observaciones con microscopía óptica (MO) las muestras se deshidrataron e infiltraron con parafina. La deshidratación del material se llevó a cabo mediante una serie de deshidratante histológico (BIOPUR®) y pre-impregnación con aclarante-pre-impregnante (BIOPUR®) (Gonzalez y Cristóbal 1997). Para la infiltración en parafina se dejó inicialmente el material en una solución de alcohol ter-butílico y aceite de parafina 1:1 en estufa a 60 °C por 8-10 h y luego se realizaron dos cambios en parafina de 10-12 h (Johansen 1940). Se efectuaron cortes seriados transversales (CT) y longitudinales (CL) de 12-18 µm de espesor con micrótopo rotativo, coloreándose luego con safranina – Astra blue (Luque *et al.* 1996) y se montaron con Bálsamo de Canadá sintético.

Los preparados histológicos fueron observados mediante un microscopio OLYMPUS CH30, equipado con cámara de video SONY ExwaveHAD, conectado a PC con placa digitalizadora DC 10 Plus.

Diseño experimental y análisis de los resultados

Se emplearon 10 explantes por tratamiento, repitiéndose cada experimento tres veces. En todos los casos, los explantes fueron distribuidos completamente al azar en el cuarto climatizado. Al finalizar cada experimento se cuantificó el número de explantes que brindaron raíces (porcentaje de enraizamiento), número de raíces neoformadas por explante y longitud promedio de las mismas. Los resultados obtenidos se expresaron como promedio de las tres repeticiones independientes provistos del error estándar correspondiente. Los resultados fueron sometidos a un análisis de variancia (ANOVA)

y las comparaciones entre las medias fueron realizadas con el test de comparación múltiple de Duncan empleándose un 5 % de nivel de probabilidad.

Resultados y discusión

En un sistema de micropropagación mixotrófico, en donde la capacidad fotosintética del propágulo es severamente restringida debido a la baja irradiación lumínica y disminución de la concentración de CO₂, resulta imprescindible el agregado de carbohidratos al medio de cultivo con fines energéticos y suministro de carbono necesarios en los procesos anabólicos propios del crecimiento y desarrollo de los órganos. Con esta premisa se formuló el primer objetivo específico a fin de establecer un nivel adecuado de sacarosa que, en combinación con el tratamiento hormonal, permitiese maximizar la tasa de neoformación de raíces adventicias a la vez que brinde un adecuado sistema radicular.

La figura 1 muestra los resultados obtenidos transcurridos 35 días de la inducción. En general, el porcentaje de explantes que brindaron raíces varió entre $3\pm 2,8$ y $53\pm 12,1$ % (Fig. 1a), dependiendo del nivel de sacarosa presente en el medio de cultivo en cada una de las fases del enraizamiento. El agregado de 30 mM de sacarosa en la inducción y 90 mM durante la diferenciación brindó un enraizamiento de $50\pm 2,6$ % con un sistema radicular compuesto por $6\pm 1,6$ raíces/estaca (Fig. 1b) y una longitud promedio de $8\pm 0,9$ mm (Fig. 1c).

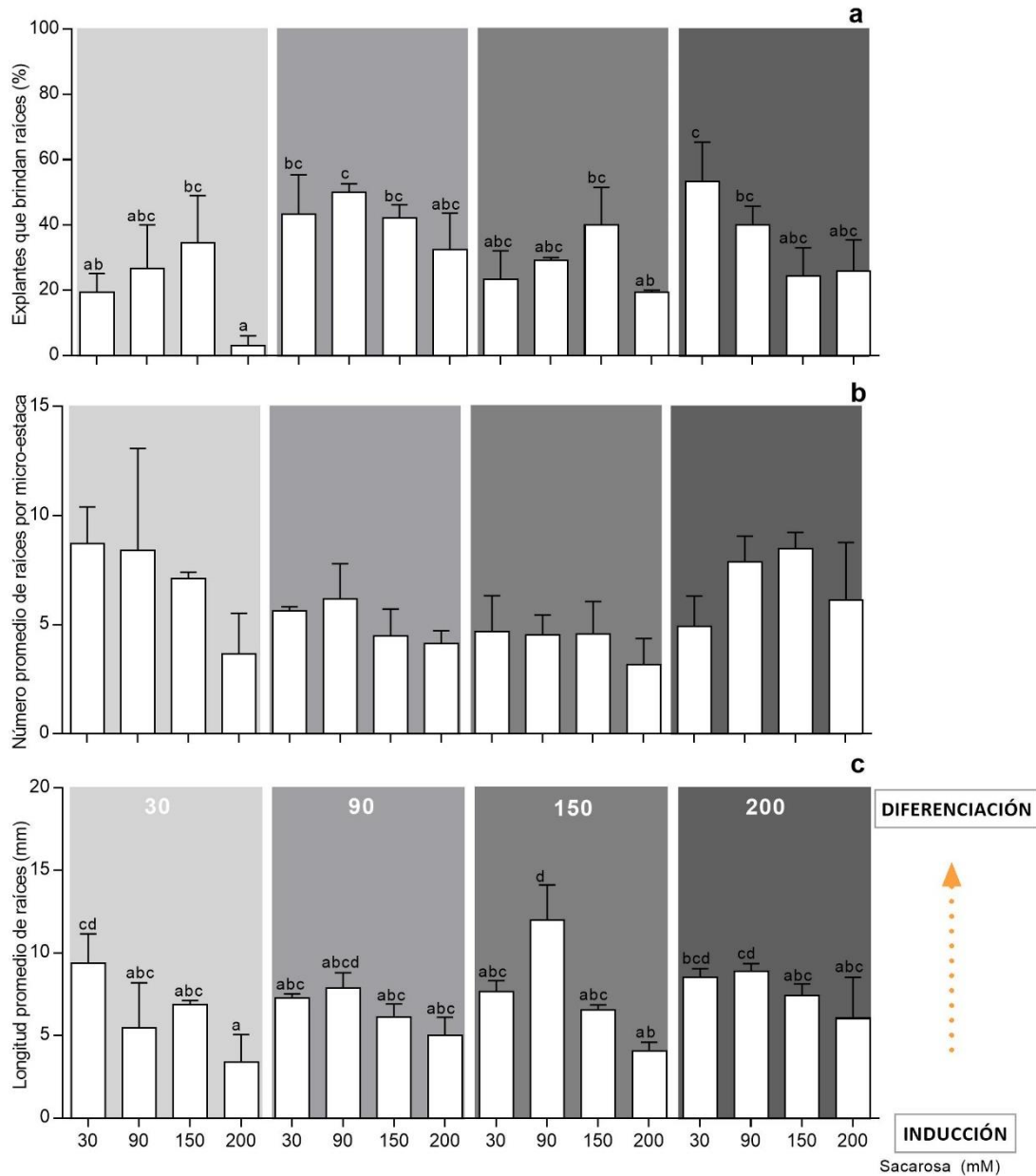


Figura 1. Efecto de la variación del contenido de sacarosa durante el transcurso del proceso morfogénico en el porcentaje de estacas enraizadas (a), número de raíces neoformadas por micro-estaca (b) y crecimiento de las raíces resultantes (c). Las micro-estacas fueron cultivadas en un medio de inducción compuesto por MS1/4 adicionado con IBA 7,5 μ M durante 7 días y transferidas a un medio de diferenciación de igual composición nutritiva pero libre de fitohormonas. En todos los casos, la barra indica el promedio de tres repeticiones \pm el error estándar de la media. Tratamientos con letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Consecutivamente, pudo observarse que, en términos de efectividad, la dilación de la fase de inducción no favorece de manera significativa la tasa final de enraizamiento (Fig. 2), disminuyendo la calidad del sistema radicular desarrollado debido a una mayor proliferación de tejidos indiferenciados (callos) en la base de la estaca (Fig. 3). Asimismo, no se divisaron diferencias estadísticas significativas respecto a los niveles de sacarosa ensayados, excepto cuando el periodo de inducción duró 17 días, en donde, un mayor contenido de azúcar en el medio de cultivo estimuló la formación de raíces ($p= 0,02$). Este incremento en el nivel de sacarosa y el mayor tiempo en presencia en la hormona produjo una abundante formación de callo con una posible reducción de la función de las raíces formadas. Debido a esto, la duración de la inducción optimo fue considerada la de 7 días en medio con 30 mM de sacarosa ya que posibilitó altas tasas de enraizamiento minimizando la formación de callo (Fig. 2; 3 d)

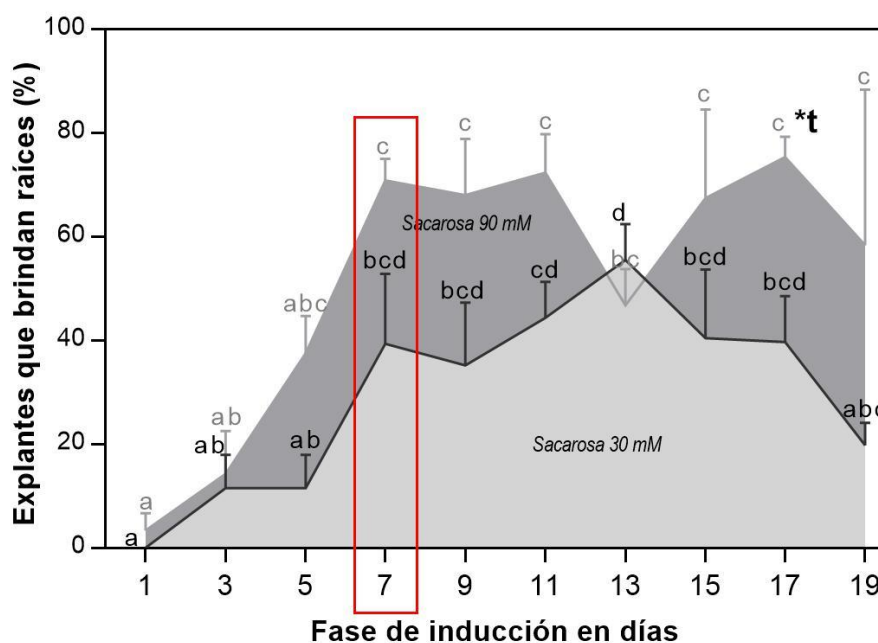


Figura 2. Análisis de la interacción entre el contenido de sacarosa y el periodo de inducción del proceso morfológico sobre la tasa de formación de raíces adventicias en micro-estacas de yerba mate cultivadas en MS1/4 adicionado con IBA 7,5 μ M y transferidas a un medio de diferenciación de igual composición sin fitohormonas hasta alcanzar 35 días de incubación. En todos los casos, la barra indica el promedio de tres repeticiones \pm el error estándar de la media. Tratamientos con letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). *t: Test de Student para datos no apareados ($p \leq 0,05$ para comparar las dos concentraciones de sacarosa en un mismo tiempo de inducción).

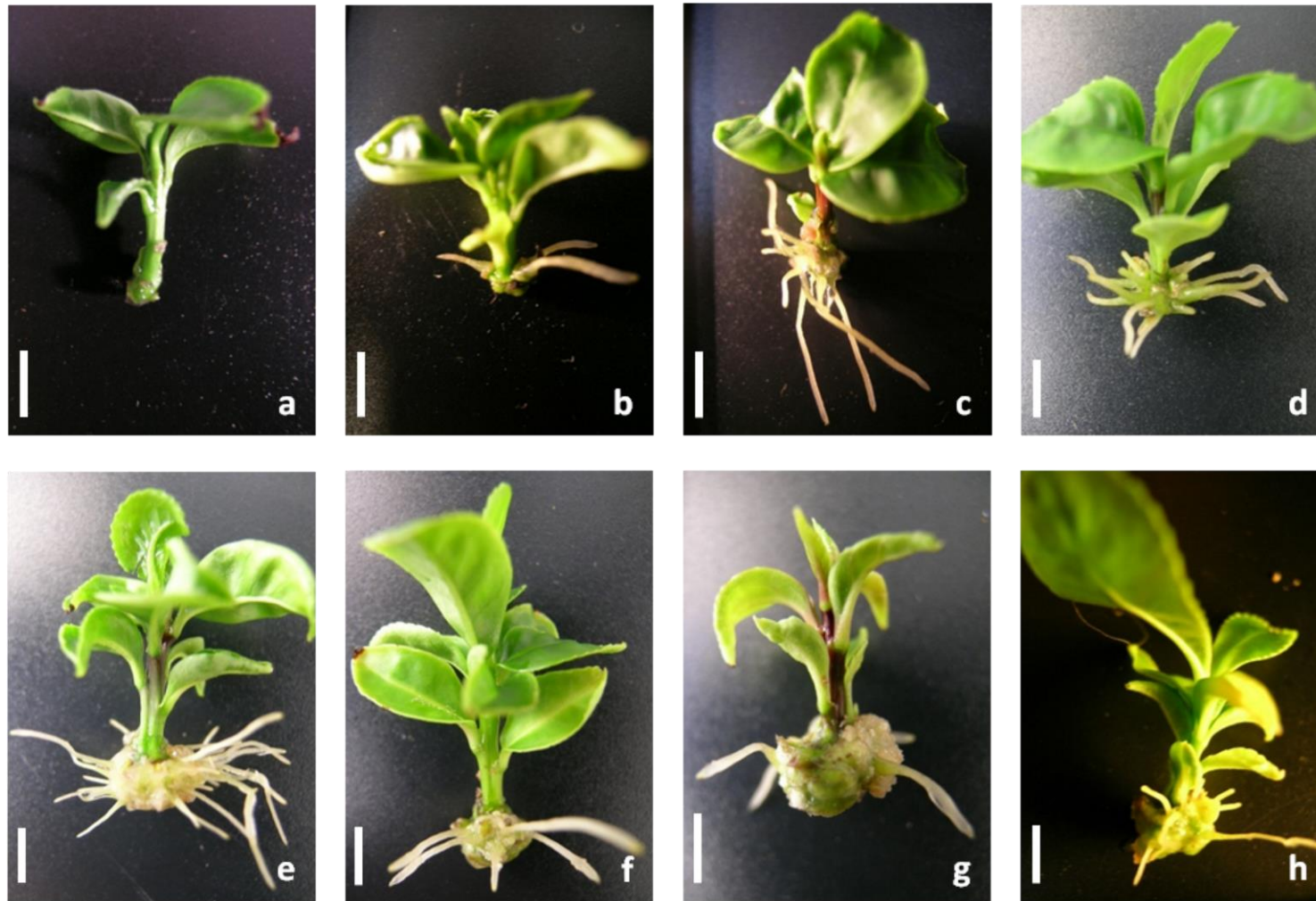


Figura 3. Respuestas de los explantes a diferentes tiempos de inducción. A) Tiempos de inducción a) 0; b) 1; c) 5; d) 7; e) 11; f) 13; g) 15; h) 17 días. La barra indica 5 mm.

La modificación del contenido de boro en los medios de inducción y expresión permitió observar diferentes respuestas, evidenciadas a través del porcentaje de enraizamiento obtenido. El experimento contempló dos tratamientos controles siendo el primero, control absoluto sin boro en ambos medios (inducción/ expresión) y el segundo la concentración de 0,27 μM de B, tanto en inducción como en expresión, concentración correspondiente a la dilución $\frac{1}{4}$ de medio basal de Murashige and Skoog (1962). La ausencia de B, en los dos medios de cultivos (inducción y expresión) imposibilitó la obtención de raíces adventicias (Tabla 1).

Una óptima respuesta morfogénica se observa con la combinación de 10 μM y 0,27 μM de boro en inducción y expresión respectivamente en el que posibilitó obtener 51,5 \pm 3,03 % de explantes enraizados con un promedio de 7,74 \pm 1,3 raíces por explante (Tabla 1).

Tabla 1 Análisis de la influencia del contenido de boro sobre el porcentaje de estacas enraizadas y el número de raíces neoformadas por micro-estacas de yerba mate cultivadas en MS1/4 adicionado con IBA 7,5 μM y transferidas a un medio de diferenciación de igual composición sin fitohormonas hasta alcanzar 35 días de incubación. Tratamientos con letras distintas indican diferencias significativas (Test de Duncan $p \leq 0,05$).

Boro en μM		Enraizamiento en %		Número de raíces/micro-estaca	
Inducción	Diferenciación				
0	0	0	a	0	a
0,27	0,27	39,39 \pm 8,0	cde	6,03 \pm 2,2	b
1		19,39 \pm 5,8	abc	2,83 \pm 1,4	ab
3		12,42 \pm 7,96	ab	2,67 \pm 2,2	ab
7		12,12 \pm 3,03	ab	5,67 \pm 2,4	b
10		51,51 \pm 3,03	e	7,74 \pm 1,3	b
0,27		1	46,36 \pm 9,71	de	5,83 \pm 1,4
	3	38,48 \pm 4,52	cde	5,59 \pm 0,9	b
	7	33,7 \pm 14,23	bcde	4,71 \pm 1,4	ab
	10	33,33 \pm 8,01	bcde	5,47 \pm 1,6	b

La concentración de boro en $\frac{1}{4}$ de la concentración del medio MS posibilitó que un 39,39 \pm 8 por ciento de explantes enraícen con un promedio de 6,03 \pm 2,2 raíces por explante, menores al tratamiento de 10 μM de boro en la inducción aunque no fueron estos valores significativamente diferentes. La ausencia de respuesta morfogénica en el tratamiento sin boro denota la importancia de este micro-elemento durante la rizogénesis

adventicia, probablemente a través de su función estructural en la pared celular, su papel en el mantenimiento de la función de la membrana plasmática y varias rutas metabólicas, como así también su efecto sobre la regulación endógena de las auxinas en la primera fase del enraizamiento adventicio (Jarvis *et al.* 1983; Parr y Loughman, 1983; Camacho-Cristóbal *et al.* 2008; Hansch y Mendel 2009). Esta falta de enraizamiento en ausencia de boro también fue observado en *Eucalyptus globulus* por Schwambach *et al.* (2005) y congruente con lo encontrado en micro estacas obtenidas de plantas de semillas de girasol en las que se observó que la carencia de boro en la solución nutritiva imposibilita el crecimiento de las raíces, aunque no la desdiferenciación de los primordios (Marschner 1995; Josten y Kutschera 1999). Otra posible explicación de la falta de respuesta en los tratamientos sin boro podría ser que estos tejidos, deficientes en boro, tendrían incapacidad de controlar los daños oxidativos que son frecuentes en especies con alto contenido de sustancias fenólicas -como *I. paraguariensis*- que son liberadas al medio extracelular cuando se prepara el vástago que será puesto en el medio de enraizamiento (Koshiba *et al.* 2009; Oiwa *et al.* 2013).

Actividad de enzimas peroxidasas

La medición de la actividad de enzimas peroxidasas (POX) en los tejidos, tanto de hojas como de tallos en *Ilex paraguariensis*, estuvo condicionada a la puesta a punto del protocolo de medición el cual contempló la evaluación del pH óptimo, como así también la mezcla de reacción adecuada. Un inconveniente que se suscita cuando se desea determinar la actividad enzimática en extractos de *I. paraguariensis* es la abundante concentración de sustancias fenólicas principalmente taninos, flavonoides y fenoles ácidos que actúan como sustancias interferentes imposibilitando el funcionamiento de la enzima en condiciones *in vitro* (Heck y Demejia 2007; Frizon *et al.* 2015). Estas sustancias interfieren con las proteínas impidiendo que las mismas realicen su función enzimática, por lo cual la medición de la actividad enzimática en extractos de tejidos vegetales crudos (sin purificación previa) de yerba mate requiere de una mezcla de reacción adecuada (Tarragó *et al.* 2008).

La evaluación de pH se realizó entre los rangos de 3,5 y 7,5 unidades de pH determinándose que independientemente de la fracción de enzimas peroxidasas el pH óptimo para la medición fue de 5,5 (Fig. 4 a, b). En general el pH de 5,5 encontrado como óptimo para *I. paraguariensis* en ambas fracciones es levemente inferior al citado

en protocolos de medición para otras especies como *Nicotiana tabacum*, *Brassica oleracea capitata var. alba* L. y *Raphanus sativus* en el que la máxima actividad la encuentran a pH de 6,5 (Bania y Mahanta 2012). Una particularidad que hace al éxito o no en la medición de la actividad de la POX en extractos de yerba mate es el correcto valor de pH ya que variaciones de media unidad alrededor del óptimo produce grandes cambios en la actividad de POX, hecho que demostraría una inestabilidad en las POX de *I. paraguariensis* (Chattopadhyay y Mazumdar 2000).

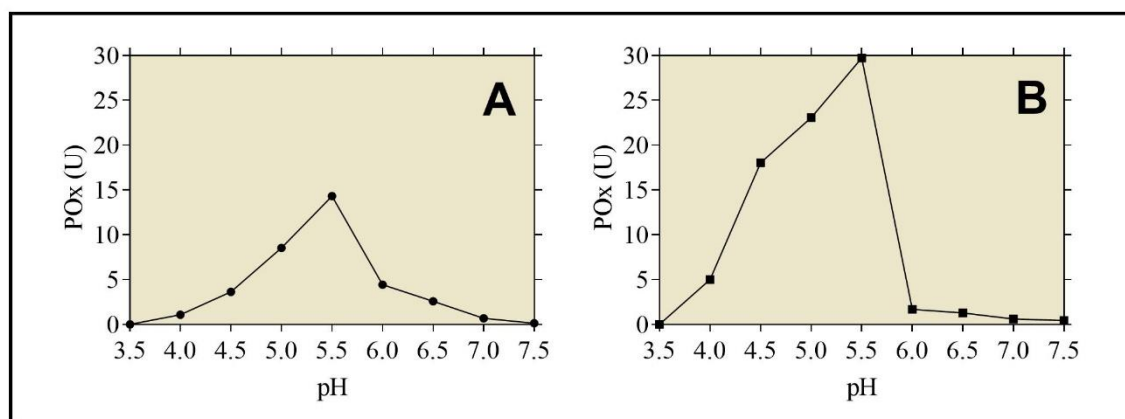


Figura 4. Efecto del pH sobre la actividad específica de enzimas peroxidadas en a) Fracción soluble y b) Fracción iónicamente unida a la pared en extractos de hojas obtenidas in vitro de *Ilex paraguariensis*. Concentración de *o*-dianisidina 0,63 mM y de H₂O₂ 20 mM. Utilizándose 0,1 M de buffer acetato para el rango de pH de 3,5 a 5,5 y 0,1 M de buffer fosfato para el rango de 6 a 7,5.

La actividad específica (actividad de la muestra/concentración de proteínas) de POX en la prueba de pH fue mayor (alrededor del doble) en la fracción iónicamente unida a la pared que en la fracción soluble. Probablemente ello se deba al tipo de órgano utilizado (tallo), a la predominancia de tejidos con baja actividad meristemática y al alto grado de lignificación, proceso en donde intervienen activamente enzimas POX (Whetten *et al.* 1998). Otra posible diferencia de actividad encontrada entre las dos fracciones se debería a la mayor concentración de sustancias fenólicas y sus efectos interferentes presentes en la fracción de POX solubles ya que esta fracción al ser el producto del primer sobrenadante queda con una mayor concentración de sustancias interferentes (Robards *et al.* 1999).

La afinidad de las peroxidadas por su sustrato (peróxido de hidrógeno) se midió a través del valor de *K_m* siendo este valor más bajo cuando existe una elevada afinidad entre la enzima y su sustrato. El valor obtenido de *K_m* para H₂O₂ fue de 6 mM, el cual

es relativamente alto comparado a los K_m reportados por Bania y Mahanta (2012) para POX de otras especies como *Nicotiana tabacum* (0,250 mM), *Brassica oleracea* (0,370 mM) y *Raphanus sativus* (0,277 mM), lo que indicaría una baja afinidad de las enzimas POX de *I. paraguariensis* por su sustrato (Fig. 5 a-b). En este sentido el perfil electroforético de extractos enzimáticos de *I. paraguariensis* demuestran la presencia de distintas bandas de isoenzimas y diferencias en los zimogramas de POXs aniónicas y catiónicas presentes en las dos fracciones analizadas (fracción soluble e iónicamente unida a la pared) (Fig. 6). En los patrones de POXs aniónicas para la fracción soluble e iónicamente unida a la pared se registraron 10 bandas de las cuales 3 fueron polimórficas para la fracción soluble y las que presentaron peso molecular medio. Los perfiles de POXs catiónicas permitieron vislumbrar 9 bandas, para ambas fracciones de peroxidasa, de las cuales una sola (de baja movilidad) fue monomórfica, presentando en la fracción iónicamente unida a la pared bandas de movilidad intermedia, las cuales no se manifestaron en la fracción soluble (Fig. 6). La diversidad de bandas de isoenzimas encontradas se debería a que las peroxidasa son consideradas como una familia multigénica de enzimas asociadas a la adaptación de las plantas a la vida terrestre en presencia de elevadas concentraciones de oxígeno; se han reportado en *Oryza sativa* y en *Arabidopsis thaliana* 138 y 73 genes respectivamente que codifican para esta enzima (Tognoli *et al.* 2002; Passardi *et al.* 2004). El conocimiento del pH, el estudio de la cinética de POX en *Ilex paraguariensis* como así también el conocimiento de las bandas de isoenzimas que componen las distintas fracciones permitieron realizar la medición de la actividad de POX en el curso de enraizamiento de segmentos de tallos *in vitro* y en el enraizamiento de macro estacas mediante enraizamiento convencional (capítulo III).

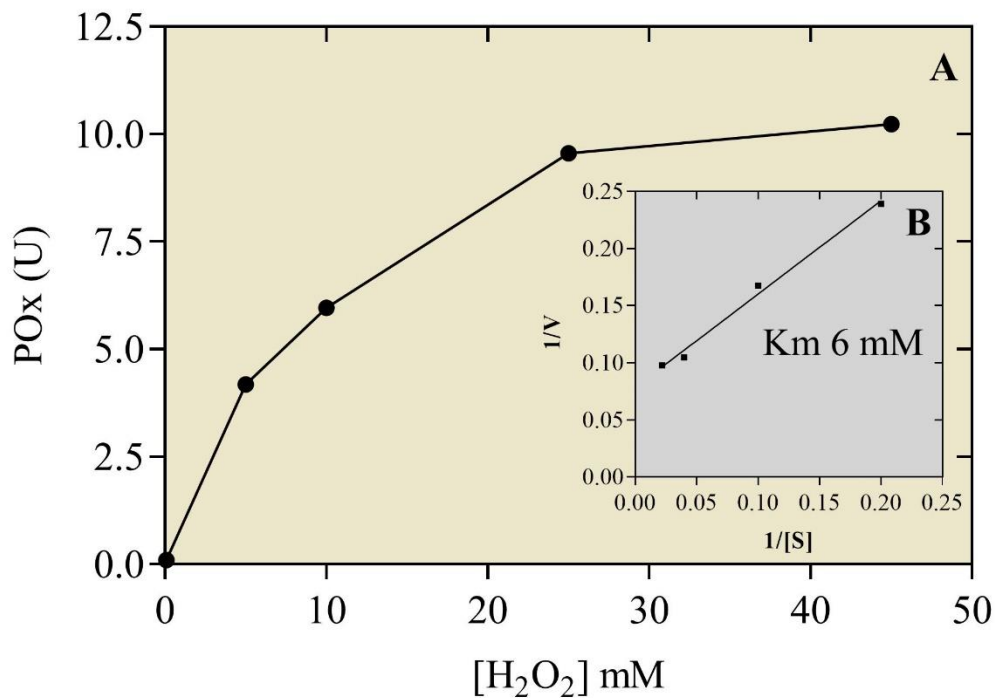


Figura 5. Curva de saturación de sustrato (H₂O₂) para la fracción de enzimas peroxidasa soluble extraídas de tejido foliar de vástagos puestos a enraizar *in vitro* a). U: Actividad específica expresada en $\text{mmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} / \text{mg} \text{ proteína} \cdot \text{ml}^{-1}$. b) Lineweaver-Burk.

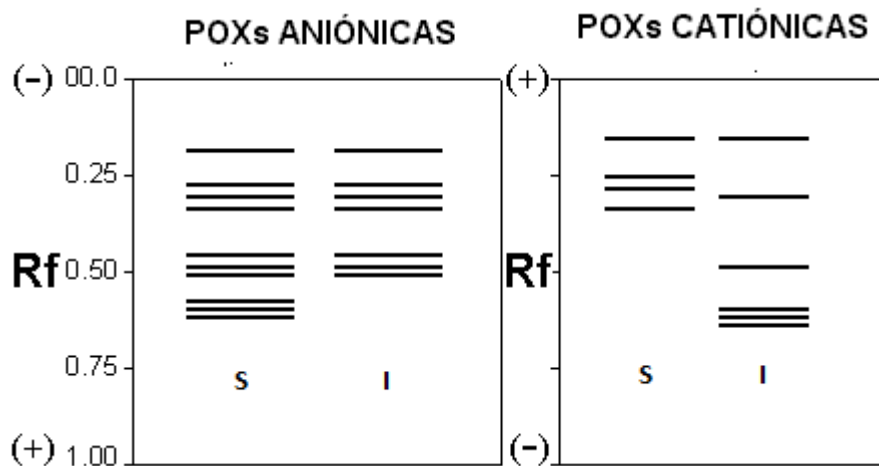


Figura 6. Zimogramas de POXs aniónicas y catiónicas correspondientes a las fracciones solubles (S) e iónicamente unidas a la pared (I).

La actividad específica de enzimas POX durante el proceso de inducción al enraizamiento *in vitro* de segmentos nodales muestra variaciones significativas a lo largo del proceso (Fig. 7). La actividad de POX comienza con valores bajos y con

tendencia a incremento en su actividad a partir del tercer día, en el cual la actividad aumenta significativamente hasta el día nueve, produciéndose un descenso en el día diez. Esta variación en la actividad de enzimas POX estaría delimitando las fases del enraizamiento adventicio en *Ilex paraguariensis* al igual que en otras especies leñosas como manzano (De Klerk *et al.* 1995) y *Gardenia jasminoides* (Stefanos *et al.* 2006). De acuerdo a Gaspar *et al.* (1982), la fase de desdiferenciación es caracterizada por una reducción en la actividad de POX (día 2), mientras que la fase de iniciación por un incremento de la actividad de la peroxidasas llegando a su pico máximo al finalizar éste periodo (día 9), y la fase de diferenciación por una caída de actividad POX la cual ocurre luego del día 9 (Figura 7). Esta observación de actividad POX durante el curso del enraizamiento adventicio fue complementado con el análisis histológico de las porciones basales de los vástagos puesto a enraizar.

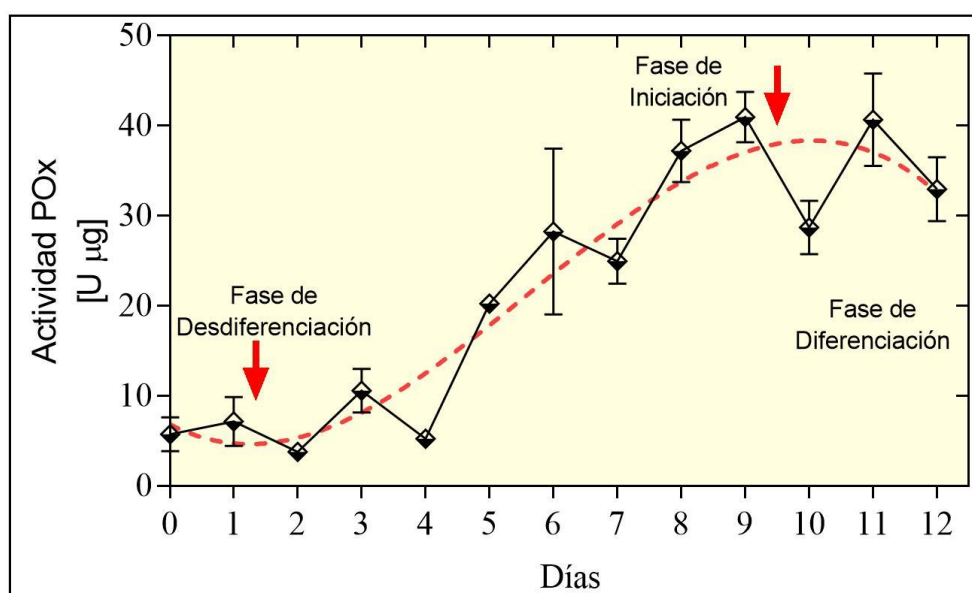


Figura 7. Evolución de la actividad de enzimas peroxidasas a lo largo de período de inducción del enraizamiento adventicio de micro-estacas de yerba mate cultivadas en MS1/4 50 g*1-1 adicionado con IBA 7,5 µM. En todos los casos, la barra indica el promedio de tres repeticiones ± el error estándar de la media. La línea punteada representa la curva de ajuste utilizando un polinomio de tercer orden.

Histología de enraizamiento adventicio *in vitro* en yerba mate

El análisis de los preparados histológicos obtenidos de los cortes de tallo a lo largo del proceso rizogénico *in vitro* de brotes de *I. paraguariensis* permitió determinar la duración y los cambios histológicos observados durante la ontogenia de la rizogénesis

adventicia. Fue posible asignar la duración y la división de las etapas según De Klerk *et al.* (1995) y Jasik y De Klerk (1997) para de esta manera asociar estos eventos a los cambios de actividad en enzimas peroxidasas.

El material utilizado como testigo fue un tallo con desarrollo de estructura primaria el cual correspondió a la micro-estaca al inicio de la inducción (Fig. 8 A). Internamente el material presenta epidermis uniestratificada, glabra; el córtex está formado por células parenquimáticas, con cloroplastos en las 4-5 capas subepidérmicas (Fig. 8 A, e, c). En el límite del córtex con el floema hay una delgada capa de fibras corticales de lumen amplio y paredes muy poco lignificadas (Fig. 8 B-C, fc). El cilindro central presenta un anillo continuo de xilema rodeado por floema, hay ocasionales fibras de paredes engrosadas y lumen reducido asociadas al xilema (Fig. 8 A-C, zv, fx, x). La médula es parenquimática (Fig. 8 A, m).

Separación de las fases del enraizamiento adventicio

- *Fase de desdiferenciación:* Esta etapa da inicio al proceso y comienza con la réplica de algunas células que se vuelven competentes para responder a la señal rizogénica de la auxina. Comprende del día 0 al 5 de la inducción y durante esta fase no se aprecian cambios histológicos en los tejidos (Fig. 8 A; B; C).
- *Fase de inducción:* Se pudo determinar que esta fase ocurre a partir del día 6; se aprecian las primeras divisiones mitóticas que darán origen a la formación del primordio radical (Fig. 8 D, flecha). Dichas divisiones ocurren predominantemente en células del parénquima floemático, pudiendo observarse con facilidad las fases mitóticas, como también las sucesivas divisiones subsiguientes (Fig. 8 D-E). Las divisiones ocurren inicialmente en toda la circunferencia del floema, originando células que mantienen sus características meristemáticas de núcleo grande y citoplasma denso (Fig. 8 E).
- *Fase de diferenciación:* A medida que continúan las divisiones celulares, las mismas se concentran en áreas puntuales constituyendo nódulos meristemáticos que representan el inicio de primordios radicales (Fig. 8 F-H). Los primordios se forman en toda la circunferencia del tallo (Fig. 8 I). Algunos aceleran su crecimiento, diferenciando un meristema apical radical bien organizado, que se

observan alrededor del día 12 y que continúa su crecimiento y emerge hacia el exterior atravesando parénquima cortical y epidermis al día 15 (Fig. 8 J-L). En esta fase De Klerk *et al.* (1995) determina que la señal de inducción al enraizamiento ya no es requerida.

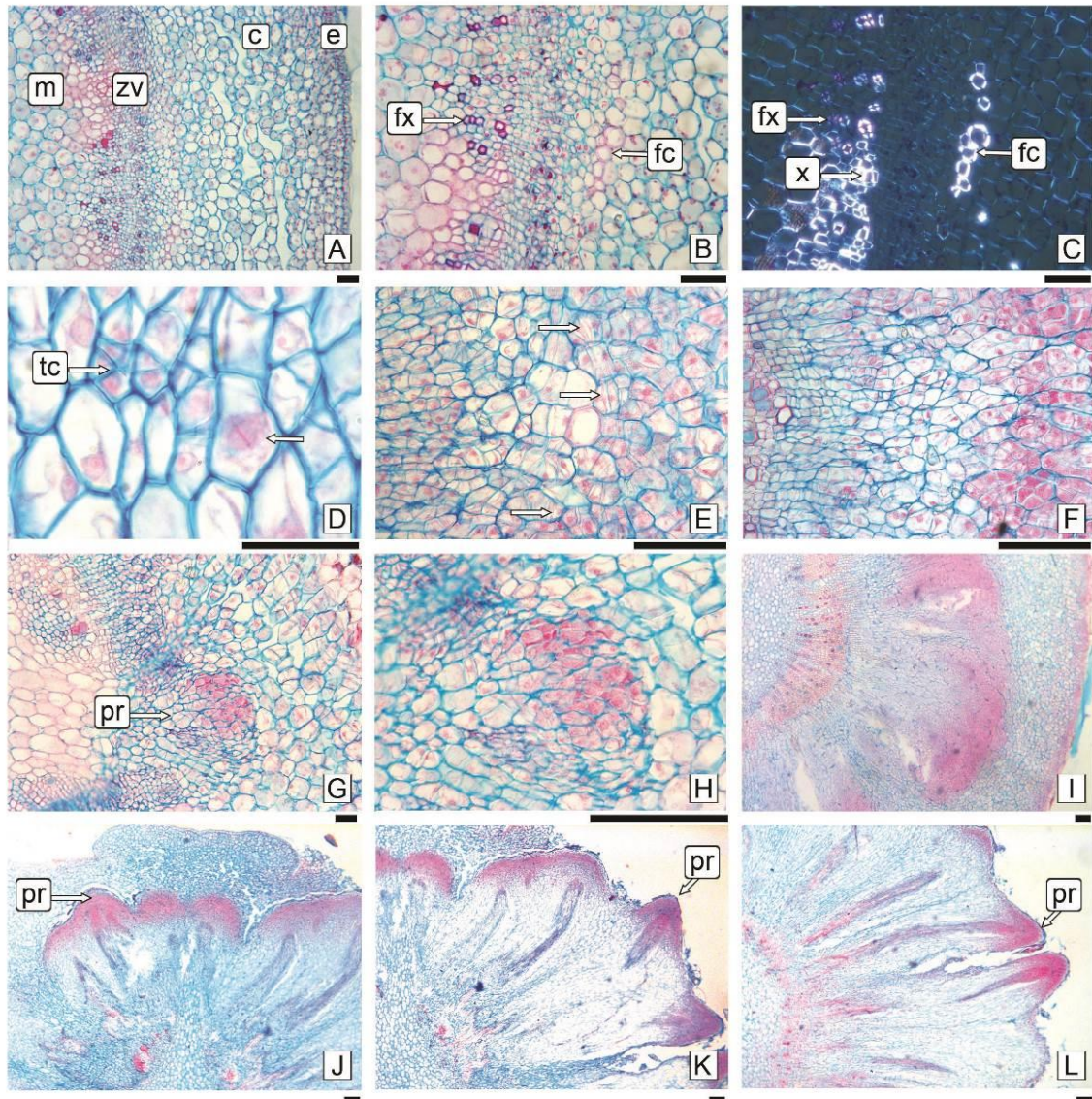


Figura 8. Histología del enraizamiento *in vitro*: Secciones transversales del tallo en diferentes días de cultivo. (A) día 1; (B-C) día 5; C. igual a B, pero con luz polarizada para mostrar elementos lignificados como las fibras y elementos traqueales; (D) diferenciación del primordio en el día 6; (E) zona vascular mostrando numerosas divisiones celulares, nótese las paredes recién formadas en las células indicadas por las flechas; (F-G) Emergencia de las raíces adventicias al día 15; (I) Áreas mesistemáticas en la circunferencia del tallo; (J-L) Emergencia de las raíces. Abreviaturas: fc: fibras corticales; pr: primordio radical; x: xilema; c: córtex; e: epidermis; fx: fibras xilemáticas; m: médula; tc: tubos cribosos; zv: zona vascular. Flechas indican células con figuras mitóticas. Escalas: D: 50 μ m, todas las restantes 0,1 mm.

Cabe destacar que las células que dan origen a las raíces adventicias son las del parénquima floemático, hecho que no es normal en otras especies como manzana (Hicks 1987; Zhou *et al.* 1992; Collet *et al.* 1994; De Klerk *et al.* 1995) castaña (Vieitez y Vieitez 1983) roble (San José *et al.* 1992), estado juvenil de (hiedra) *Hedera helix* (Geneve *et al.* 1991) en las cuales las raíces son originadas a partir del cámbium vascular. En las especies de difícil enraizamiento o en estados adultos de algunas especies se observa una segunda alternativa de iniciación de las raíces adventicias: de forma indirecta a partir de callos que se generan internamente por la proliferación del cámbium como capas del lado de floema (Lowell y White 1986; Collet *et al.* 1994; Altamura 1996). Este diferente origen encontrado en el enraizamiento *in vitro* podría deberse a cambios en el estado fisiológico del material utilizado el cual forma una zona con campos meristemáticos que formarán los meristemas de raíces al igual que lo que ocurre en castaña cuando se trabaja con material juvenil (Ballester *et al.* 1999).

Estudios previos realizados en el enraizamiento convencional de *I. paraguariensis* utilizando macro-estacas, demostraron que las raíces adventicias se inician a partir de divisiones en distintos sentidos de células del cámbium vascular (Tarragó *et al.* 2005). Esta diferencia observada en la iniciación de la rizogénesis adventicia entre macro-estacas y micro-estacas y la formación de múltiples primordios de raíces en el contorno del vástago en el enraizamiento *in vitro* estaría indicando que la inducción es más eficiente en este último sistema probablemente por tratarse un material con mayor grado de “juvenilidad” al igual que lo que ocurre en castaña (Ballester *et al.* 1999).

Consideraciones finales del capítulo

Independientemente de la concentración de sacarosa, la utilización de la auxina durante la fase de inducción es determinante para lograr enraizar micro-estacas de yerba mate *in vitro*. La concentración de sacarosa óptima para el enraizamiento *in vitro* de *Ilex paraguariensis* fue de 30 mM en la inducción y 90 mM en la expresión. Un leve incremento de la concentración normal respecto del MS ¼ en el medio de inducción produjo un aumento en el porcentaje de enraizamiento; como así también un incremento en el número de raíces obtenido. La necesidad de boro es determinante en el proceso y el análisis de la curva de POX nos permitiría separar el evento en fases

(desdiferenciación; inducción y expresión), las que se sustentan con los cambios anatómicos observados.

Los estudios histológicos permitieron establecer la duración de las diferentes etapas del proceso rizogénico *in vitro* de vástagos de yerba mate y además identificar las células a partir de las cuales se originan los primordios radicales estableciendo que la banda de fibras presentes en el tallo no constituyen un obstáculo que impida la emergencia de las raíces adventicias.

CAPÍTULO III: ENRAIZAMIENTO POR MACRO-PROPAGACIÓN

Introducción

El establecimiento de un método útil para la propagación vegetativa de árboles adultos de yerba mate es dificultoso debido a la reducida capacidad de enraizamiento de las estacas. Sin embargo, no se conoce si las características de los esquejes se asocian con diferencias genéticas en la capacidad de enraizamiento o simplemente la capacidad de enraizamiento es la expresión del crecimiento y la condición de la planta dadora de la que se obtienen los esquejes, la cual al ser expuestos a los cambios estacionales son sometidas a una variedad de tensiones (alta temperatura, radiación, fotoperíodo, precipitación, etc.) que influyen en el crecimiento y la capacidad de proporcionar material de corte (estacas o esquejes) que formen raíces adventicias (Day y Loveys 1998; Kibbler *et al.* 2004; Tate y Page 2018). El éxito en el enraizamiento de los esquejes ha sido a menudo correlacionado con la temperatura ambiente en el momento de coleccionar el material para la preparación de los mismos (Hansen 1990). Sin embargo, el aumento del enraizamiento no puede ser únicamente, el resultado de la temperatura por sí sola, ya que la temperatura y otros factores ambientales producirían cambios del estado fisiológico de la planta dadora de esquejes y estos influirían en el proceso de enraizamiento (Kibbler *et al.* 2004; Husen y Pal 2007). En este sentido las plantas ajustan el nivel de hormonas endógenas libres y una variedad de otros metabolitos (azúcares, fenoles y flavonoides) con el fin de reducir el impacto negativo de la situación adversa (estrés abiótico). La influencia ambiental puede actuar a través de la variación en el nivel de auxina y ciertos fenoles que afectan a la sensibilidad al estímulo de enraizamiento ejercido por la auxina (Curir *et al.* 1990; Faivre-Rampant *et al.* 2002). Numerosos trabajos confirman la actividad de ortodihidroxi fenoles como co-factores de enraizamiento o sinergistas por lo que ácidos p-cumárico, cafeico y clorogénico mejoran el enraizamiento cuando se suministran solas e incrementan los efectos de los tratamientos inductivos usando hormonas auxínicas (Jarvis 1986). Por otra parte, trabajos anteriores demuestran que los flavonoides promoverían el enraizamiento de estacas *Ilex paraguariensis* (Tarragó *et al.* 2005). Encontrándose que la Quercetina posee un efecto no solo promotor de la rizogénesis adventicia sino también contribuyendo a una mejora en el sistema radical por un incremento en la distribución de las raíces alrededor del perímetro de las estacas sin afectar el número de raíces en la misma. En contraste, las adiciones de naringenina o rutina al medio de cultivo inhibió el enraizamiento *in vitro* en micro estacas de *Ilex dumosa* (Luna *et al.* 2003). Al mismo tiempo, muchas plantas naturalmente sintetizan compuestos polifenólicos en respuesta a

estreses bióticos o abióticos (Vermerris y Nicholson 2008) los cuales son necesarios para el funcionamiento fisiológico normal de las plantas ante esas condiciones, y los cuales afectan negativamente el proceso morfogénico (Compton y Preece 1986). Además de la condición fisiológica de las plantas dadoras de explantes, y las diferencias en su metabolismo, la comprensión de los factores morfo-fisiológicos en función del estado de madurez del vegetal podrían resolver la dificultad de enraizar estacas provenientes de material adulto, favoreciendo la producción en gran escala de individuos con características superiores.

Objetivo específico

Dilucidar los factores que controlan el enraizamiento de estacas de yerba mate, para la construcción de un protocolo de propagación convencional con altas tasas de enraizamiento.

1. Estudiar el diámetro de las estacas y su influencia en la capacidad de enraizamiento.
2. Analizar la interacción del estado fenológico de la planta madre, las condiciones de luz solar y el contenido total de fenoles solubles.
3. Determinar la actividad de enzimas peroxidasas en el curso del enraizamiento de estacas plurinodales de yerba mate.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se utilizaron dos tipos de explantes: uno proveniente de plantas que crecían en macetas en condiciones de invernadero o de plantas con diferentes tratamientos lumínicos y otro, de plantas que crecían en condiciones de plantaciones comerciales. En ambos casos los materiales fueron cultivares o plantas elegidas de una plantación comercial y las cuales sobresalían por sus características productivas y de sanidad. Cabe aclarar que los cultivares utilizados a esta tesis fueron de variada edad (referida a la fecha de plantación) y son descriptos en detalle más adelante en cada experimento.

Plantas que crecen en condiciones de invernadero

Se utilizaron plantas adultas (más de 10 años) de yerba mate (cultivar SI-49 Las Marías S.A.C.I.F.A) que crecían en macetas de 4 l rellenas con suelo laterítico en condiciones de invernadero y de las cuales se extrajeron segmentos de tallos, conteniendo 4-6 fitómeros manteniéndose 1 hoja distal con su lámina foliar reducida al 50 %.

Inducción al enraizamiento y condiciones de incubación

Las estacas fueron pre-tratadas con una solución acuosa de Quercetina (3,3',4', 5,7-pentahidroxi-flavona) 500 μ M durante 2 hs (Tarragó *et al.* 2005). El procedimiento de inducción se realizó seguidamente y consistió en sumergir la base de las estacas (2 cm) en una solución alcohólica (50 % v/v) de ácido indolbutírico (IBA) 4.000 ppm por 4 min para posteriormente realizar la inmersión de las mismas en una mezcla física de 2 % PPZ (1-fenil, 3-metil, pirazol -5- ona), 10 % sacarosa, 10 % Captan y talco inerte. Luego del tratamiento antioxidante y de inducción, las estacas eran implantadas en contenedores de 150 ml de capacidad (tubetes) conteniendo perlita con 0,5 g de fertilizante de liberación controlada (Osmocote® 18:5:9) como substrato, e incubadas bajo condiciones ambientales controladas. Las bandejas con las estacas se cultivaron durante 6-8 semanas en una cámara de crecimiento con una temperatura del aire de día / noche de 25-27 / 20-22°C y substrato a temperatura de 22 a 25°C (Fig. 9). La humedad relativa dentro de la cámara se mantuvo a 90 % durante los primeros 7 días por un sistema de micro-aspersión y luego disminuyó gradualmente hasta 70 %.

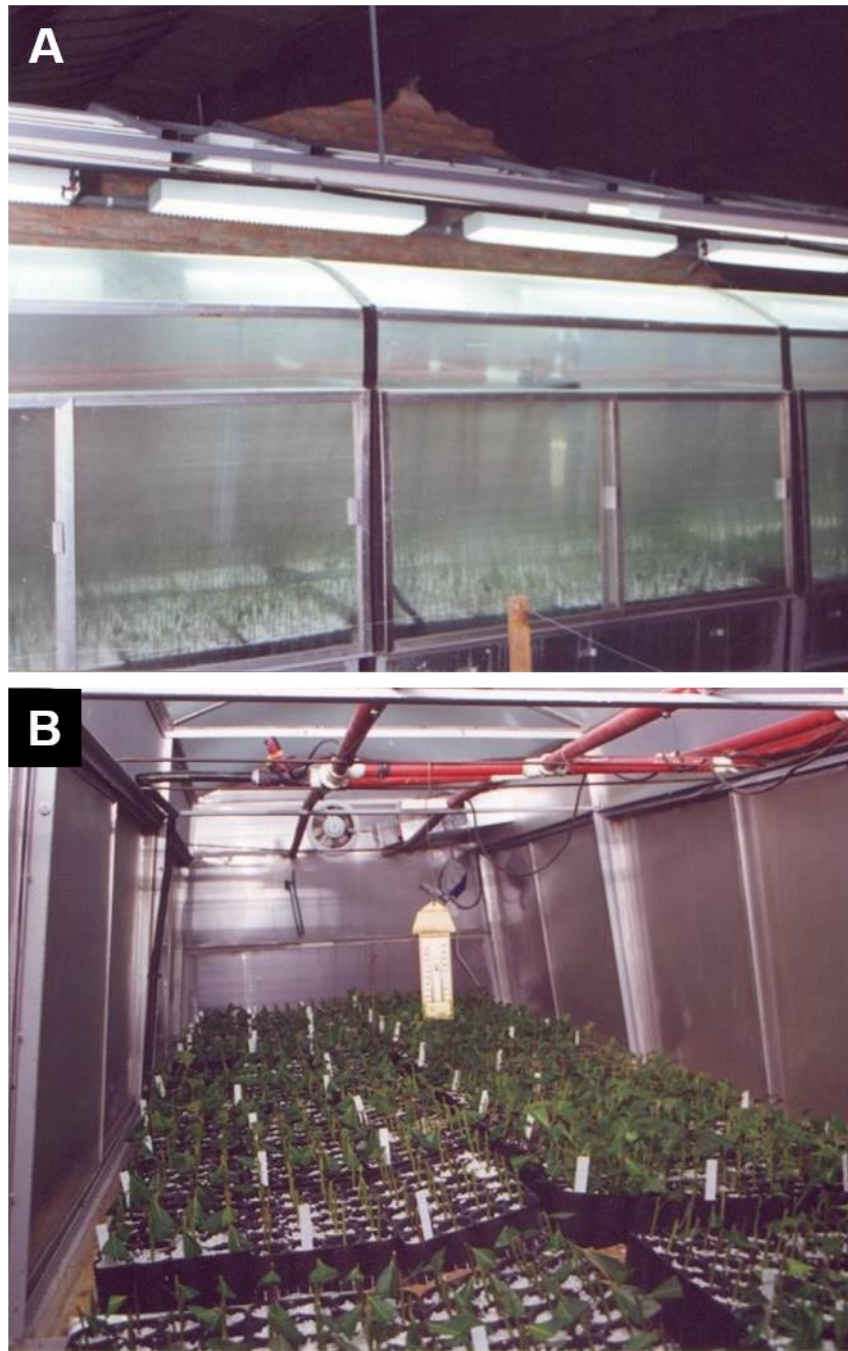


Figura 9. Cámara de enraizamiento donde se realizaron la incubación de las estacas. A) Vista exterior de la cámara B) Vista interior de la cámara con las estacas de uno de los experimentos realizados.

El fotoperíodo se mantuvo durante todo el período de enraizamiento a 12 h usando 20 % de la radiación solar ($150-180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, PAR), más el agregado de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ utilizando ocho lámparas fluorescentes blancas frías (40 W) ubicadas por afuera de la cámara de crecimiento y a 1,8 m de altura de los esquejes (Fig. 9).

Para los diferentes ensayos se utilizaron 40 estacas por tratamiento y se realizaron 3 repeticiones. Luego de finalizado el ensayo se evaluaron los siguientes parámetros

cuantitativos: sobrevivencia (%), estacas que permanecen verdes), estacas que brindan raíces (%) y, en algunos experimentos, peso seco de raíces y de brotes.

Efecto del diámetro de la estaca en el enraizamiento

Para evaluar el efecto del diámetro de la estaca sobre la capacidad rizogénica se utilizaron fitómeros de distintos diámetros, todos de ramas de la misma estación de crecimiento. Éstos fueron medidos en su base y separados en tres grupos: A) estacas de menos de 3 mm; (B) de 3 a 5 mm y (C) de más de 5 mm de diámetro. Las estacas una vez preparadas fueron inducidas e incubadas según se describió anteriormente.

Analizar la interacción del estado fenológico de la planta madre, las condiciones de luz solar y el contenido total de fenoles solubles.

Para responder a este objetivo se realizaron dos ensayos; el primer experimento tuvo como objetivo determinar la correlación entre la irradiancia PAR con el enraizamiento y el segundo, el estado fenológico de la planta dadora de estacas y el enraizamiento. Para el primer ensayo se utilizaron plantas del cultivar SI-49 cultivadas en macetas de 4 l de capacidad llenas de tierra roja laterítica. Las plantas fueron sometidas a diferentes irradiancias de luz cubriendo el techo, los lados este y oeste de estructuras de marco de hierro con diferentes capas de redes de sombreado (media sombra). Cada estructura contenía en su interior 12 macetas y los tratamientos de luz (uno por estructura) se repitieron tres veces (Fig. 10). Las condiciones ambientales registradas a lo largo del experimento -120 días- fueron las siguientes: temperatura media 26,8°C (mínimas de 21,2 y máximas de 32,7°C), promedio de 65 % HR (valores en el rango de 42 a 89 %). Periódicamente se procedió a regar las macetas para mantener la humedad del suelo en capacidad de campo. Este experimento se llevó a cabo en verano y los esquejes para los experimentos de enraizamiento se recogieron al final del segundo período de crecimiento.

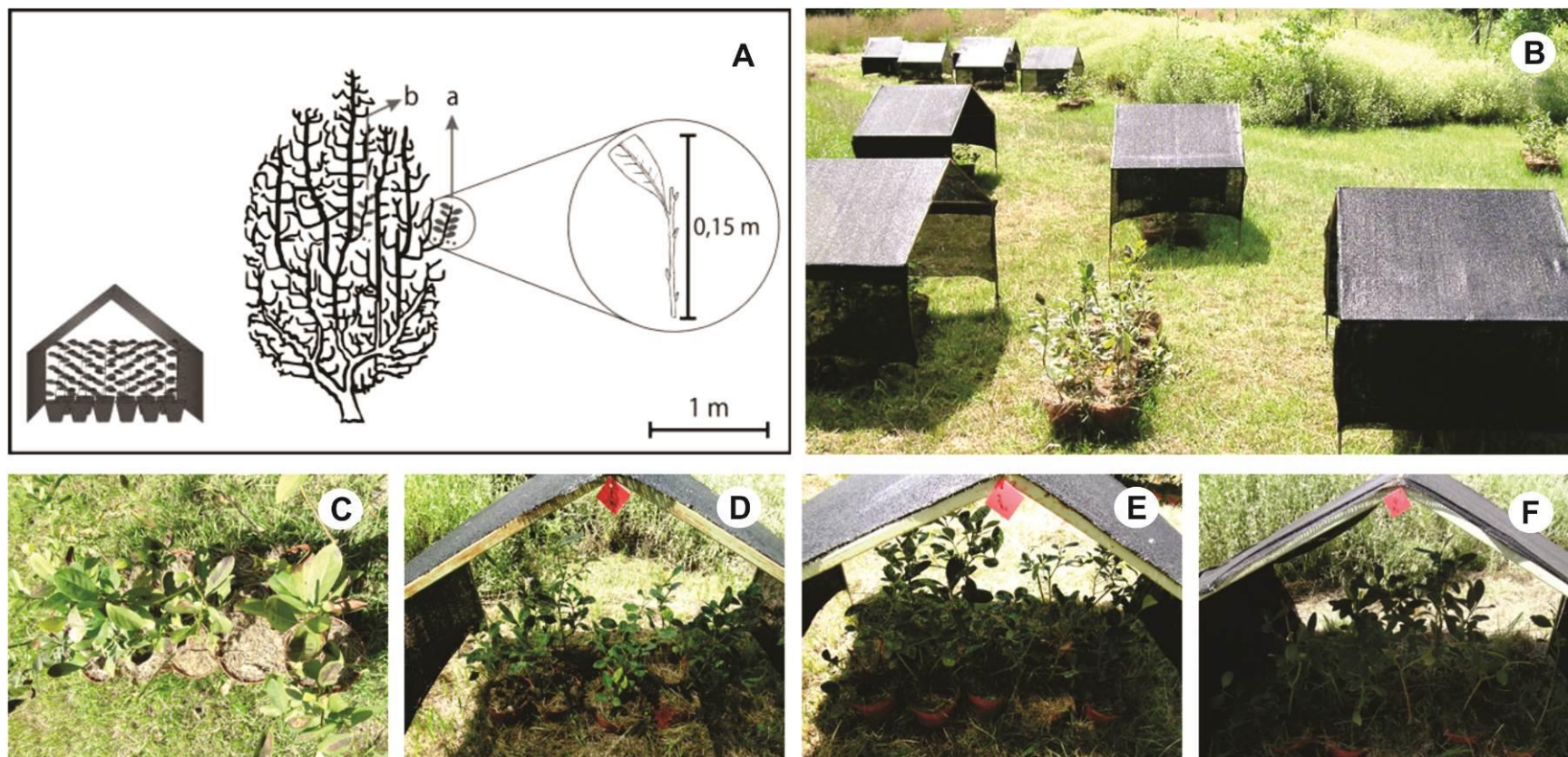


Figura 10. Modificación del contenido de fenoles totales en brotes de yerba mate mediante el crecimiento de plantas bajo diferentes niveles de radiación. A) Esquema general del experimento en sus dos etapas (en macetas bajo diferentes niveles de radiación y a campo en plantas adultas. B) Vista panorámica de la distribución de los tratamientos de diferentes niveles de sombreados. C; D; E y F corresponden a 100, 15, 3 y 1,5 % de PPFD.

Un segundo experimento se diseñó a partir de los resultados obtenidos del experimento anterior, para evaluar si la temporada y la estructura de dosel de las plantas en condiciones de campo tienen un efecto sobre el proceso de enraizamiento. Este experimento se realizó con 15 cultivares de plantas adultas que crecían en condiciones de campo en la localidad de Gobernador Virasoro, Argentina (28° 80 20" S, 55° 85 40" W). El sitio se caracteriza por una precipitación media anual de 1.800 mm, distribuidos principalmente en primavera y otoño; temperatura media de 22 °C, baja frecuencia de heladas con suelo Ultisol. Los brotes de 35 a 40 cm de largo se recogieron de la estructura central y periférica de cada planta (dosel interior y exterior) al final de cada período estacional de crecimiento en plantas de 14 a 78 años de edad cultivadas a diferentes densidades (Tabla 2). El tratamiento para el traslado de los brotes al laboratorio y el acondicionamiento realizado se describen en Tarragó *et al.* (2005). Los esquejes se prepararon a partir de brotes semi-leñosos los cuales se fraccionaron en unidades con seis a nueve nodos (10 a 12 cm de largo, 3 a 5 mm de diámetro) y en los que se dejó únicamente la hoja superior reducida a la mitad retirando las restantes.

Tabla 2 Características del germoplasma y condiciones del canopeo utilizado en el ensayo de contenido de fenoles en hojas y su relación en el enraizamiento. Nota: la edad corresponde a los años desde la implantación hasta la fecha de colección del material.

Cultivar	Sexo	Edad (Años)	Plantas/ha	Estructura del canopeo
A-4	Masculino	78	1.250	Abierto
A-5	Masculino	78	1.250	Abierto
A-6	Masculino	78	1.000	Abierto
A-7	Femenino	78	1.000	Abierto
A-8	Masculino	78	1.000	Abierto
A-10	Femenino	78	1.000	Abierto
V-1	Masculino	30	1.250	Abierto
V-2	Masculino	30	1.250	Abierto
V-12	Masculino	30	1.250	Abierto
V-4	Femenino	25	2.222	Medio
V-5	Femenino	27	3.300	Cerrado
V-6	Masculino	18	3.300	Cerrado
V-11	Masculino	17	3.300	Cerrado
V-16	Masculino	17	3.300	Cerrado
V-17	Masculino	17	3.300	Cerrado

Para la determinación de fenoles totales se tomaron 125 mg de material vegetal proveniente de hojas maduras de cada clon previamente congelado. Cada muestra fue suspendida en 500 µl de metanol e incubada a temperatura ambiente durante 10 min.

Posteriormente se centrifugó a 2500 g durante 10 min, recogiendo el sobrenadante. El sedimento se volvió a extraer en las mismas condiciones combinándose ambos sobrenadantes. El extracto en su conjunto fue concentrado diez veces por evaporación a 45°C. Para estimar la cantidad de compuestos fenólicos en los extractos metanólicos se diluyeron 1:40 con agua, utilizando una mezcla de reacción de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) diluido 8 veces con agua destilada (200 µl) y 20 % Na₂CO₃ (650 µl) (Singleton y Rossi 1965). Los tubos se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 120 min y posteriormente se midió la absorbancia a 765 nm de longitud de onda con un espectrofotómetro de absorción molecular (Spectronic® Genesys 5, EE.UU.). Los resultados fueron expresados en equivalente de ácido gálico por mg de hoja, sobre la base de un ácido gálico de grado analítico (Sigma-Aldrich) utilizado como reactivo para la preparación de la curva estándar. La cuantificación de los caffeoyl derivados se llevó a cabo utilizando métodos validados de HPLC estándar externo, utilizándose estándares puros de Carl Roth. Se utilizó una fase inversa IB-SIL RP 18 (5 µm, 250 x 4,6 mm ID) columna Phenomenex y un gradiente que consiste en disolvente A: agua: ácido acético (98:2); y disolvente B: metanol: ácido acético (98:2). Empleándose un amplio gradiente, desde 15 % B a 40 % B en 30 min; 40 % hasta 75 % de B en 10 min y 75 % de B a 85 % B en 5 min. La velocidad de flujo se ajustó a 1,2 ml/min y la identificación y cuantificación se llevaron a cabo por análisis simultáneo de tiempos de retención y la detección con un detector de UV Varian 9050 y Varian 9065 detector de fotodiodo Array a 325 nm para los derivados caffeoyl y 254 nm para la rutina. Se inyectaron muestras con un inyector Rheodyne equipado con un bucle de 100 l (Filip *et al.* 1998, 2001).

Determinación de la actividad de enzimas peroxidasas en el enraizamiento de macro estacas de yerba mate.

Se utilizó como material vegetal el clon (adulto) SI49 que crecía en condiciones de invernadero y se realizaron los siguientes tratamientos. 1) Control IBA 4000 ppm en solución alcohólica por 5 minutos 2) Quercetina 500 µmolar durante 1 hora y 3) Quercetina 500 µmolar durante 1 hora más el tratamiento inductivo con IBA 4.000 ppm en solución alcohólica durante 5 minutos. La actividad de enzimas peroxidasas se midió según lo descrito en el capítulo II, pero en esta oportunidad en el curso del enraizamiento de macro estacas de yerba mate. Muestras de 5 mm de la base de las estacas y de cada

tratamiento fueron tomadas a los 4; 8; 12 16, 20; 24; 28 y 32 días de iniciado la inducción (3 por día de muestreo).

Diseño experimental y análisis de los resultados

El diseño experimental utilizado fue en bloques al azar realizándose tres repeticiones por tratamiento utilizándose test de Duncan y LSD test con un valor de $p \leq 0,05$ para separar las medias de los tratamientos, los cuales constaban de 24 esquejes y los experimentos se repitieron tres veces. Los datos se analizaron con ANOVA y módulos de regresión. Los análisis de regresión lineal se realizaron entre los valores de PPFD y las variables: contenidos de fenoles totales; % de esquejes oxidados; % de enraizamiento; y número de raíces por esqueje. Para el análisis de los resultados se utilizó el Software INFOSTAT versión 2016 (Di Rienzo *et al.* 2016).

Resultados y discusión

Efecto del diámetro de la estaca en el enraizamiento

El estado de madurez del explante afectó notoriamente la supervivencia y ulterior rizogénesis de los segmentos plurinodales de yerba mate (Fig. 11). En tal sentido, más del 50 % de las estacas con grado de madurez A y B (hasta 5 mm de diámetro) sobrevivieron en las condiciones estudiadas mientras que sólo un $15,8 \pm 10$ % de las estacas con grado de madurez C (mayor a 5 mm de diámetro) superaron el estrés traumático propio de la técnica y mantuvieron sus funciones metabólicas activas. En consecuencia, 47 ± 12 y $44 \pm 7,1$ % de las estacas con grados de maduración A y B, respectivamente brindaron raíces; mientras que solo $12 \pm 8,7$ % de los explantes con maduración C manifestaron dicho proceso morfogénético, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (test de Duncan, $p \leq 0,05$) (Fig. 11 A, B).

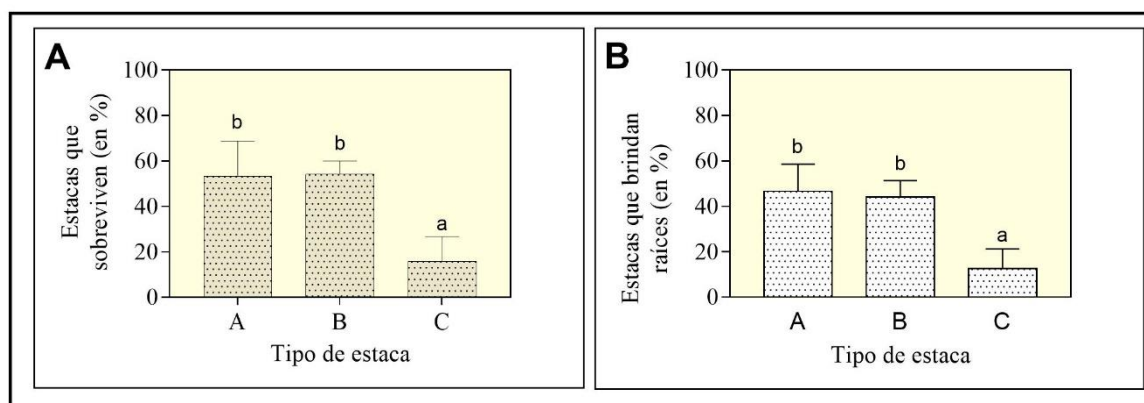


Figura 11. Efecto que ejerce el diámetro de la estaca sobre la supervivencia (A) y ulterior rizogénesis adventicia (B) de la misma. En todos los casos, la barra indica el error estándar de la media (SEM). Letras distintas indican diferencias significativas (test de Duncan, $p \leq 0,05$).

Esta variación del proceso rizogénico en función del diámetro y otros aspectos de la morfología de la estaca fue estudiada en *Prunus avium* por Dick y Leakey (2006) y en *Azadirachta indica* por Palanisamy y Kumar (1997) concluyendo que los esquejes de menor diámetro enraízan mejor que los de mayor diámetro y estas diferencias serían asociadas a una menor abscisión foliar de las hojas remanentes en las estacas, sumadas a otras características fisiológicas diferentes entre los dos tipos de estacas. Trabajos realizados más recientemente por Tate y Page (2018) demuestran resultados similares a los obtenidos en esta tesis pero trabajando con *Santalum austrocaledonicum* y en el cual las estacas de diámetro pequeño y medio son las que poseen mayor capacidad de

enraizamiento; lo cual estaría asociado a una pérdida de la competencia de las células receptoras de la señalización hormonal conforme avanza su grado de madurez de la estaca. Del mismo modo, el estado de madurez del esqueje afectó el crecimiento de brotes y raíces. Esquejes preparados de la parte media y distal de la rama y correspondientes a los grados de madurez A y B favorecieron el crecimiento tanto de brotes como de raíces (Fig. 11-12).

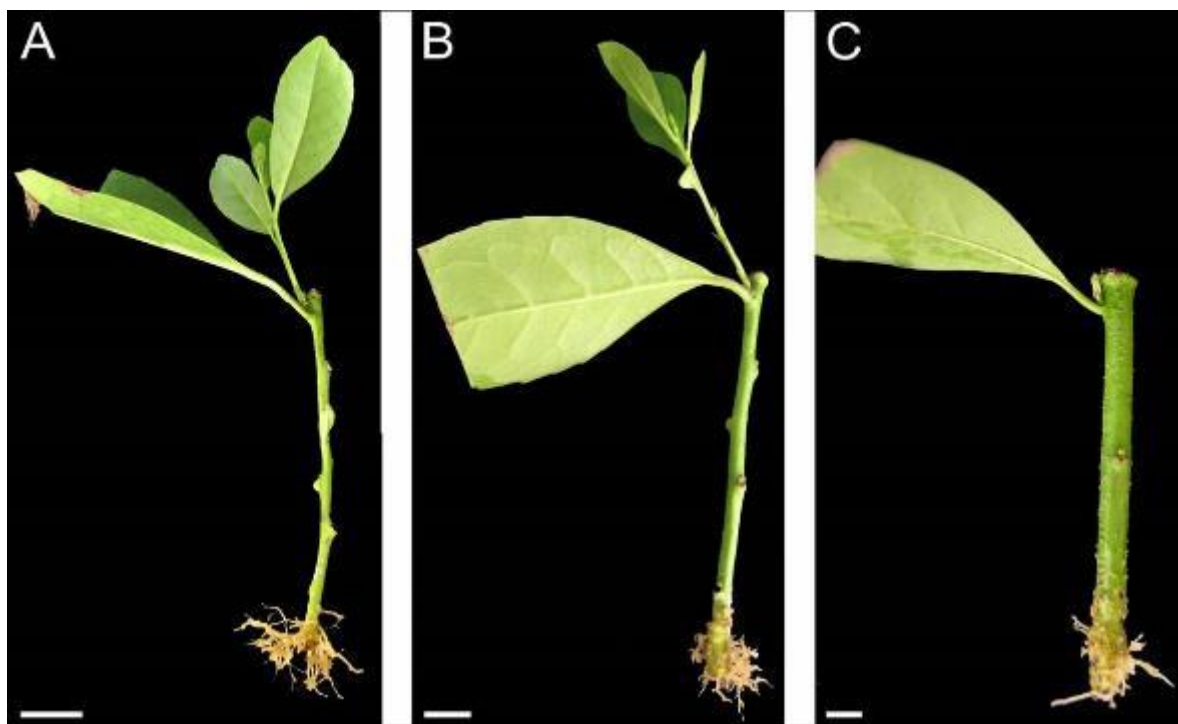


Figura 12. Vista de las estacas enraizadas a los 35 días de iniciado el experimento. Estacas con distintos diámetros A) menor a 3 mm; B) entre 3 y 5 mm; C) mayor a 5 mm. Las barras indican 1 cm.

El peso seco promedio de raíces por estaca varió entre $138 \pm 29,9$ y $42 \pm 29,4$ mg (A-B y C, respectivamente); mientras que el crecimiento de los brotes fue máximo cuando se emplearon estacas de grado B (Fig. 13). Este comportamiento diferencial de las estacas de diámetro pequeño y mediano respecto a las de mayor diámetro fue observado en distintas especies (Leakey y Mohammed 1985; Burgess *et al.* 1990; Foster *et al.* 2000) y estaría relacionado a un menor contenido relativo de carbohidratos, minerales y reguladores del crecimiento en las estacas de mayor diámetro, en la cuales aumenta la proporción de madera (Dick y Dewar 1992; OuYang, *et al.* 2015).

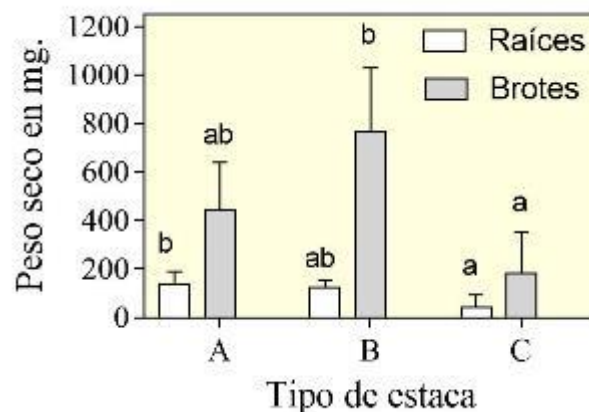


Figura 13. Efecto que ejerce el diámetro de la estaca sobre el peso seco de raíces y brotes. En todos los casos, la barra indica el error estándar de la media (SEM). Letras distintas indican diferencias significativas (test de Duncan, $p \leq 0,05$).

Analizar la interacción del estado fenológico de la planta madre, las condiciones de luz solar y el contenido total de fenoles solubles

Las condiciones ambientales en las cuales crecen las plantas dadoras de esquejes pueden influir en su capacidad de enraizamiento a través del cultivar, su edad y forma de crecimiento, por lo cual se realizaron dos tipos de ensayos 1) en condiciones semi-controladas con plantas en macetas y 2) a campo, con cultivares de distinta edad y hábito de crecimiento. En la figura 14 se puede observar el crecimiento que tuvo el clon (SI49) cuando se lo mantuvo bajo diferentes niveles de radiación PAR en los ensayos semi-controlados: entrenudos cortos y brotes más compactos en las plantas que estuvieron expuestas a 100 % de radiación PAR (Fig. 14 A) respecto a las que estuvieron expuestas a una radiación de 15 y 3 % (Fig. 14 B-C).

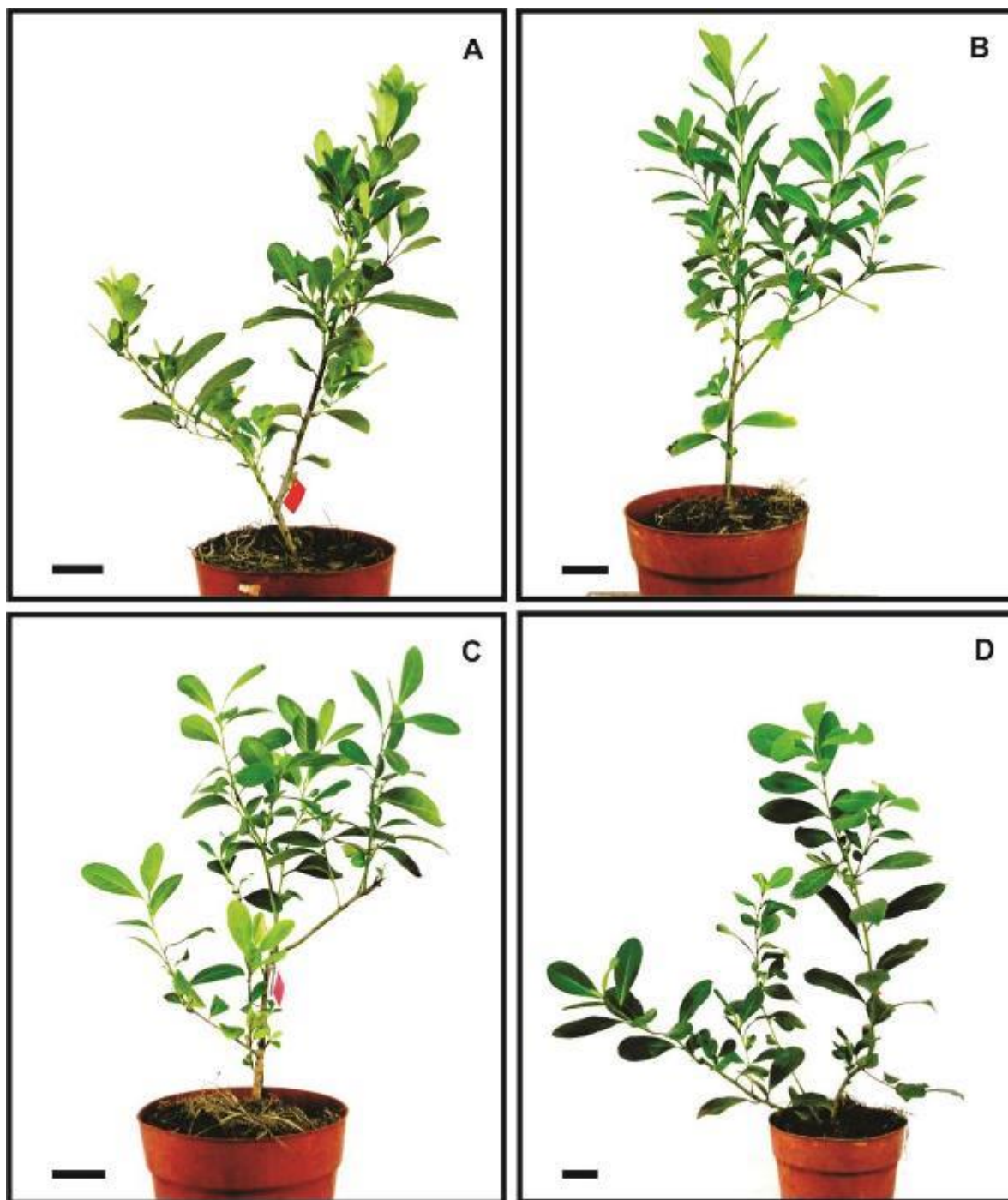


Figura 14. Plantas de *I. paraguariensis* creciendo bajo diferentes niveles de radiación. A) 100, B) 15; C) 3 y D) 1,5 % de PPFD. La barra indica 5 cm.

En la tabla 3 se presentan las variables respuesta obtenidas a partir del tratamiento de las plantas dadoras de esquejes a distintos niveles de radiación PAR. La oxidación de los esquejes varió entre 19 ± 11 a 88 ± 4 % cuando el nivel de irradiancia se incrementó de 1,5 % a PPFD 100 ($R^2=0,64$). El incremento de la irradiancia determinó un aumento del contenido de fenoles totales cuantificados a partir de las hojas obteniendo una correlación

positiva ($R^2 = 0,7$). De esta manera el enraizamiento adventicio disminuyó de 67 ± 5 a 3 ± 3 % conforme se aumentó la radiación incidente de 1,5 % a 100 % ($R^2 = 0,7$) y el número de raíces por estaca mostró un patrón similar a las otras variables descritas anteriormente las cuales se vieron afectadas negativamente por los altos niveles de radiación PAR a los que fueran sometidas las plantas dadoras de estacas (Fig. 15).

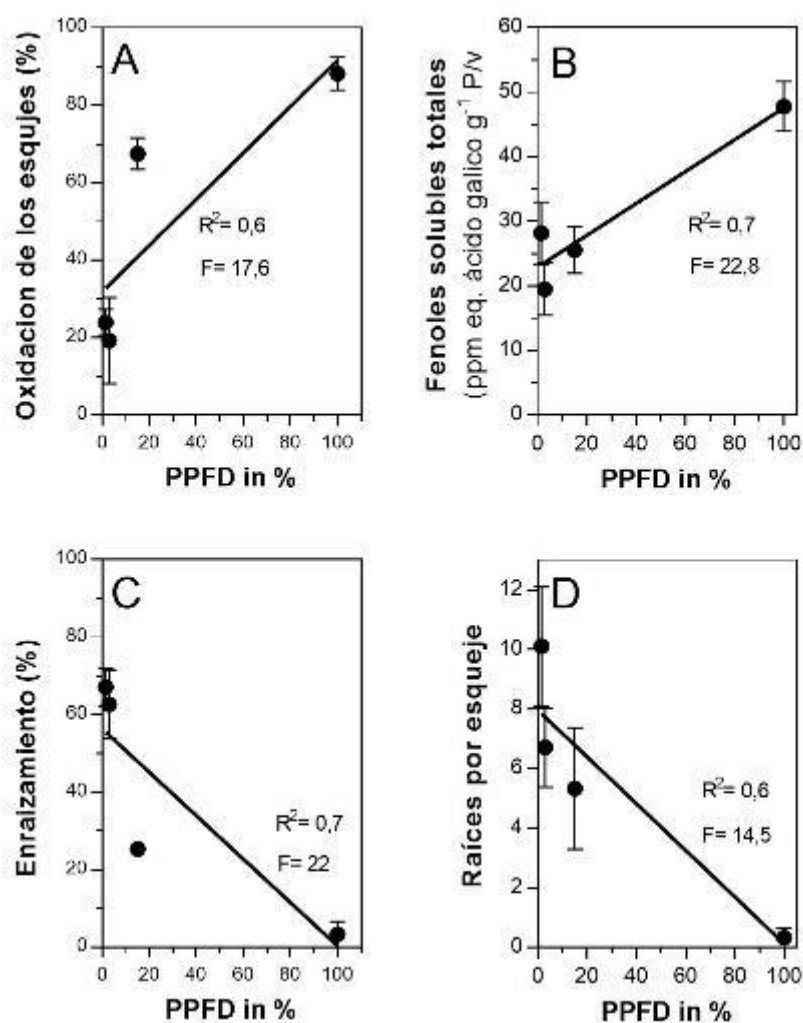


Figura 15. Influencia de la irradiancia PAR (PPFD) en el total de fenoles solubles, oxidación y enraizamiento de esquejes obtenidas de plantas que crecían en macetas.

En el experimento 2 se analizó la capacidad de enraizamiento de los esquejes tomados de diferentes cultivares, edades de plantas y condiciones de cultivo según se explicó anteriormente en materiales y métodos y se detalla en la tabla 2, y cuyos

resultados son mostrados en la tabla 4 y en la Fig. 16. Considerando la capacidad de enraizamiento el cultivar afectó fuertemente el éxito del proceso rizogénico ($p < 0,0001$) lo que nos permitió dividir a estos en dos grupos, difíciles y fáciles de enraizar (Tabla 4). Al primer caso (de enraizamiento difícil) corresponderían los cultivares que enraízan entre 20 al 30 %, mientras que los de fácil enraizamiento serían aquellos que enraízan entre el 40 y 90 %. En consecuencia los cultivares A-6, A-7, V-2, V-5, V-6, y V-17- podrían considerarse como cultivares difíciles de enraizar, mientras que A-4, A-5, A-8, V-1, V-4, V-11, V-12, V-16, y SI49 serían cultivares de fácil enraizamiento (Tabla 4; Fig. 17). Considerando la edad de los cultivares estudiados, el análisis estadístico no mostró una relación positiva entre el enraizamiento y la edad de la planta donante, mientras que la época en que se colectaron los esquejes tuvo un efecto variable y depende del cultivar. En la mayoría de los casos, el enraizamiento fue mayor en primavera y verano que en el otoño ($p < 0,0001$) con la excepción de A-8 (Tabla 4). Si bien, no se ha encontrado correlación entre la capacidad de enraizamiento y la estructura del dosel de las plantas, cuando la densidad varió de 1.000 a 5.300 plantas por hectárea, la posición de las ramas de la planta madre (interior y exterior del canopeo) afectó la capacidad de enraizamiento, dependiendo de la temporada y del cultivar. De hecho, el enraizamiento de los clones A-5 y V-11 (78 y 17 años de edad, respectivamente) fue mayor en primavera y el mejor resultado se obtuvo cuando los esquejes se recogieron de las ramas interiores del dosel. De lo contrario, el verano tuvo un efecto positivo sobre el proceso de enraizamiento de V-1, V-12, V-16, con una mayor interacción entre la posición del dosel y el cultivar. Aunque los cultivares V-1 y V-12 tenían la misma edad, densidad y pertenecían a cultivos en igual densidad, los resultados obtenidos fueron dispares respecto al porcentaje de enraizamiento de las estacas obtenidas del interior o exterior del canopeo aunque los esquejes tomados del interior del canopeo tienen, en general, una mejora en su capacidad de enraizamiento.

En general, los niveles de compuestos fenólicos solubles fueron mayores en las hojas sometidas a condiciones de alta irradiación obtenidas de la periferia de la copa, respecto a las muestras recogidas del dosel interior (Tabla 4; Fig. 16), lo que se correlaciona con el patrón de oxidación observado, excepto en los clones A-4, A-8, A -10, y V-5, en los cuales el contenido de compuestos fenólicos fue bajo y la oxidación de las estacas también. Ello permite inferir que los resultados de la oxidación de las estacas no debería ser explicado sólo por el contenido total de fenoles y que dependerá del cultivar

(Tabla 4). La fig. 16 muestra la relación entre el enraizamiento y el contenido de fenoles totales para todos las cultivares estudiados y según el lugar de extracción de las estacas (interior y exterior del canopeo), pudiéndose observar claramente que el contenido de fenoles totales es mayor en los brotes extraídos de la periferia del canopeo (círculos rojos) que los del interior del canopeo (círculos azules) y que en general los esquejes extraídos del interior tienen mayor tasa de enraizamiento, principalmente en verano y primavera. Éste comportamiento se debería a que en estos momentos del año la radiación es mayor lo que determinaría un mayor contenido de fenoles en los tejidos, según se demostró en esta tesis en el ensayo de sombreo.

Tabla 3 Efecto del cultivar, edad de plantación, posición de la brotación y contenido de sustancias fenólicas solubles en la respuesta a la oxidación y enraizamiento de estacas de *Ilex paraguariensis* extraídas del campo.

Cultivar (Edad)	Stand de plantas/ha	Estructura del canopeo	Posición del brote	Compuestos fenólicos solubles	Oxidación en %	% de enraizamiento		
						Primavera	Verano	Otoño
A-4 (78)	1250	Abierto	Interior	31,054±1,58	25±1,2*	24±10,3	53±1,4	17±2,9
			Periférico	65,857±4,01***	10±5,2	12±6,9	45±2,6	22±1,9
A-5 (78)	1250	Abierto	Interior	23,466±13,8	31±6,6	75±6,9*	15±2,1**	26±4,9
			Periférico	28,272±3,950	30±3,3	24±2,6	55±3,4	5±5
A-6 (78)	1000	Abierto	Interior	30,779±2,55	2±2	11±0,7	25±1,8*	11±5,5
			Periférico	57,000±9,026*	67±2,9***	10±5,2	15±0,4	10±5,2
A-7 (78)	1000	Abierto	Interior	23,546±2,88	28±4,1	3±3	0	0
			Periférico	55,391±10,384*	49±8,9*	25±5,5	16±1,2**	10±5,2
A-8 (78)	1000	Abierto	Interior	16,576±9,1	70±8,9*	16±5,3	5±2,5	37±6,5
			Periférico	34,062±1,067	30±2	36±3,2*	56±4,0**	37±6,5
A-10 (78)	1000	Abierto	Interior	27,917±5,1	48±2,8***	12±2,6	12±2,1	0
			Periférico	34,228±2,117	14±1,4	1±	13±1,6	0
V-1 (30)	1250	Abierto	Interior	24,493±5,1	41±6,9	35±2,9*	21±3,3	16±0,8
			Periférico	36,745±2,566	40±5,8	29±2,1	52±13,6	11±5,5
V-2 (30)	1250	Abierto	Interior	22,516±3,7	92±2,1	28±2,8	8±8	11±5,5
			Periférico	34,399±4,340	100±0	25	0	8±8
V-12 (30)	1250	Abierto	Interior	24,263±2,4	0	36±7,3*	65±0,8**	7±7
			Periférico	27,285±2,783	22±6,9	12±3,2	3±3	0
V-4 (25)	2222	Abierto	Interior	30,182±642	10±3,2	56±1,4	72±3,9	53±7
			Periférico	36,015±1,455*	14±7,5	49	53±1,5	30±1,6
V-5 (27)	3300	Medio	Interior	27,322±1,744	64±7,2	25±1,3*	8±3,9	6±2,9
			Periférico	55,634±3,758**	0±	11±3,3	32±5,1	0

Tabla 3. Continuación...

Cultivar/edad	Stand de plantas/ha	Estructura del canopeo	Posición del brote	Compuestos fenólicos solubles	Oxidación en %	% de enraizamiento		
						Primavera	Verano	Otoño
V-6 (18)	3300	Medio	Interior	30,309±7,984	32±5,1	20±2**	7±1,9	0
			Periférico	51,533±3,604	50±4,1	0	0	0
V-11	3300	Medio	Interior	24,025±3,34	7±3,7	89±5**	7±3,5*	16±0,8
			Periférico	35,046±1,892*	18±5,1	44±4,3	27±1,2	10±5,2
V-16 (17)	3300	Medio	Interior	21,836±1,63	0	30±3**	88±6,5*	0
			Periférico	35,683±1,992**	25±5,4	0	36±7,2	0
V-17 (17)	3300	Medio	Interior	30,972±2,51	36±3,7	32±6.1*	26±1,2	20±12,4
			Periférico	32,508±5,41	25±9,1	3±3	25±5,7	26±4,9
SI-49 (14)	5600	Cerrado	Interior	12,834±7,64	33±9,5	NT	70±1,6	NT
			Periférico	25,418±6,83***	29±6,4	NT	54±4,2	NT

Para la determinación de sustancias fenólicas solubles, fueron procesadas hojas de brotes tomados de la parte interna de la planta y periféricas a la copa correspondientes al segundo flash de brotación (verano). Cada valor muestra la media±SEM. NT no testado. *, **, y *** refleja diferencias significativas entre la posición de los brotes a los niveles de P<0,05, P<0,01 y P<0,001 respectivamente.

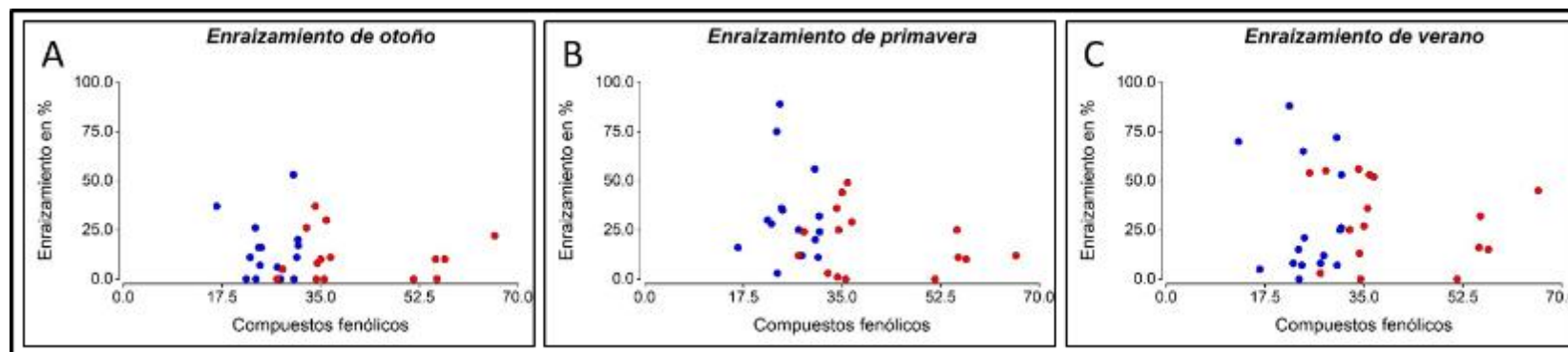


Figura 16. Respuesta al enraizamiento adventicio y su relación con el contenido de fenoles totales en esquejes extraídos del interior de canopeo (azul) o del exterior del canopeo (rojo) para el enraizamiento de otoño (A); primavera (B); y verano (C). El contenido de fenoles totales esta expresado en equivalente de ácido gálico por mg de hoja.



Figura 17. Estacas enraizadas de los clones V-16 (arriba) SI 49 (abajo), extraídos del exterior (A; C) y del interior (B; D) del canopeo. La barra indica 1 cm.

El contenido endógeno de algunos difenoles (ácido clorogénico, ácidos dicafeoilquínico) y flavonoides (ácido cafeico, rutina) extraído de hojas de diferentes clones indica que su concentración no está vinculada con la capacidad de enraizamiento y su variación estaría asociada con el cultivar y con el nivel de radiación con que crece la planta donante (Tabla 5).

Tabla 4 Efecto del cultivar, estructura del canopeo, posición del brote y sus interacciones con el contenido de fenoles en hojas de *Ilex paraguariensis* en el segundo flash de crecimiento.

Cultivar	Posición	CHLA	3,4-CQA	3,5-CQA	4,5-CQA	CAA	RUT
V-6	Interior	49,5±0,4	19±0,1	36,3±0,4	50,3±0,8	0,73±0,03	27,3±0,2
	Periférico	51±0,4	20,4±0,1	56,9±0,6*	59,6±0,6*	0,49±0,01*	43,4±0,5*
V-16	Interior	52±0,3	19,2±0,1	40,7±0,2	47,7±0,5	0,53±0,001	30±0,2
	Periférico	43,1±0,3*	17,3±0,1	62,5±0,4*	55±0,3*	0,44±0,004*	44,7±0,4*
SI-49	Interior	38,6±0,2	28±0,3	54,3±0,3	65,5±0,6	0,72±0,005	39,4±0,4
	Periférico	47,8±0,3*	17,9±0,1*	47,7±0,5*	44,2±0,3*	0,43±0,004*	62,5±0,4*

Los datos son expresados como mg g⁻¹ de peso seco liofilizado. El valor medio fue obtenido de cuatro muestras (n = 4). CHLA ácido clorogénico, 3,4-CQA 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-CQA 3,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-CQA 4,5-dicaffeoylquinic acid, CAA ácido cafeico, RUT rutina. * Diferencias significativas entre las posiciones del brote P<0,05 (t tests).

La variación en la capacidad de enraizamiento fue el resultado tanto de la diferencia genotípica como del estado fisiológico de las plantas madre. En este estudio, la dificultad de separar los efectos medioambientales de las diferencias genéticas se superó mediante la comparación de esquejes de un cultivar único cultivado en macetas y sometido a diferentes condiciones de irradiación (experimento 1). El enraizamiento evaluado a través de su porcentaje fue influenciado negativamente por la irradiación, la que probablemente determina una temperatura más elevada y menor humedad relativa a nivel del dosel. Considerando que el hábitat natural de *I. paraguariensis* es el bosque, bajo las sombras de los árboles de *Araucaria angustifolia*, en las condiciones de baja densidad del flujo de fotones y alta humedad, el aumento de la radiación solar y la demanda de agua por evapotranspiración resultante afectarían negativamente el estado fisiológico de la planta madre (Sansberro *et al.* 2004). En respuesta a esta situación adversa, las plantas pueden sintetizar una variedad de compuestos orgánicos tales como azúcares, aminoácidos y sustancias fenólicas extremadamente heterogéneas que pueden ir desde simples monómeros a polímeros muy grandes (Bray *et al.* 2000; Croteau *et al.* 2000; Luo *et al.* 2008). Estas sustancias fenólicas se pueden combinar con proteínas de manera reversible mediante enlaces de hidrógeno o de manera irreversible por oxidación, formando quinonas que se polimerizan rápidamente con las proteínas mediante enlaces covalentes (Loomis *et al.* 1966). Estos compuestos oxidados inhiben la actividad de numerosas enzimas y pueden resultar en la disminución en el

enraizamiento y/u oxidación letal de los esquejes, mostrando claramente una alta correlación entre la irradiación y el contenido fenólico soluble en hoja que promueve la declinación y muerte de los esquejes cuando son puestos en condiciones de enraizamiento (Compton y Preece 1986). Una consideración a tener en cuenta es que durante el período de crecimiento (primavera a otoño), las plantas de yerba mate tienen tres momentos de rápida de brotación, que se alternan con otros de poco crecimiento, en el que las plantas pueden estar sometidas a diferentes estreses ambientales tales como déficit hídrico y períodos de alta temperatura (Sansberro *et al.* 2004). Considerando lo expuesto, se analizó el efecto de la estructura de las plantas, la época de colecta de las estacas y la posición de la misma en la planta en función de la supervivencia y enraizamiento de esquejes. De esta manera, los resultados de los experimentos confirmaron que el nivel de contenido fenólico soluble fue mayor a partir de las hojas expuestas a la radiación plena PAR 100 % que los recogidos desde la zona central de la planta sometida a una condición más adecuada, sin embargo, el contenido de fenoles en hojas no siempre muestra una correlación con el ennegrecimiento de los esquejes. Ello podría explicarse en base a la heterogeneidad química de estructura fenólica que podría ser un estimulador o inhibidor del factor de enraizamiento adventicio (Faivre-Rampant *et al.* 2002; Stefancic *et al.* 2007). El análisis de los compuestos fenólicos y flavonoides individuales reveló que las condiciones del entorno pueden influir en la cantidad de compuestos detectados, mientras que el tipo de componentes químicos presentes en los extractos de hojas se mantuvo estable en el medio ambiente determinado por la posición de la rama. En conclusión, los resultados obtenidos proporcionan evidencias que apoyan la hipótesis de que el estado fisiológico de la planta madre en el momento en que se cortan esquejes es de suma importancia para el posterior enraizamiento en *Ilex paraguariensis*. La influencia sobre el contenido total de fenoles solubles aumenta en plantas expuestas a altas irradiancias y afecta negativamente el proceso de enraizamiento ya que el producto de su oxidación causa el ennegrecimiento y la muerte de los esquejes.

Determinar la actividad de enzimas peroxidadasas en el enraizamiento de macroestacas de yerba mate

El efecto de la adición de Quercetina con o sin IBA en la inducción al enraizamiento de estacas plurinodales de yerba mate se puede observar en la figura 15. La inducción al enraizamiento adventicio mejoró con la adición de IBA más Quercetina en comparación con los tratamientos control (IBA solo) y Quercetina. La mejora del tratamiento Quercetina más IBA respecto de control, solo con IBA, consistió en un incremento del 13,8 % de enraizamiento, un mayor número de raíces por estaca, mayor longitud y presencia de raíces secundarias (Fig. 18 A). Este efecto promotor de la interacción de Quercetina e IBA en el enraizamiento adventicio de yerba mate fue observado anteriormente por Tarragó *et al.* (2005) y su empleo incrementaría el número y la distribución de la raíces en el contorno de las estacas. La longitud de raíces no presentó variaciones entre los tratamientos (Fig. 18 C) mientras que el número de raíces por estaca y el número de estas que tenían raíces secundarias fue mayor en el tratamiento con Quercetina más IBA (Fig. 18 B, D).

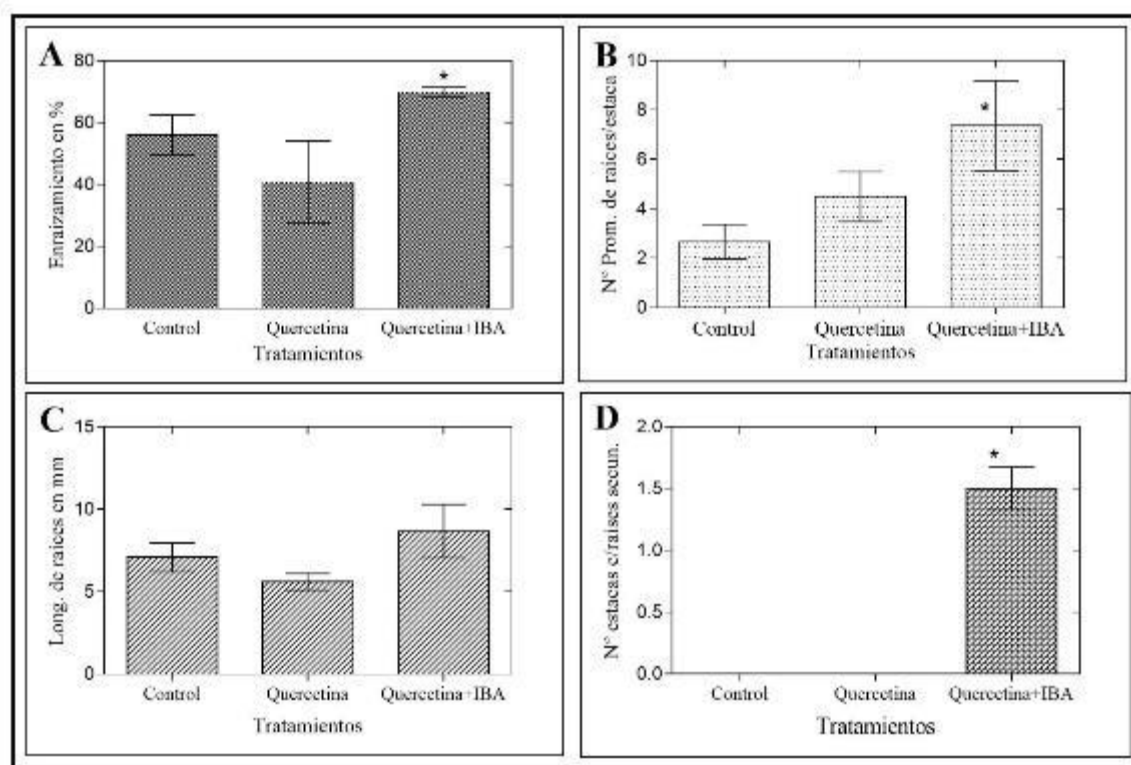


Figura 18. Respuestas obtenidas de la interacción de auxina flavonoide en el enraizamiento de estacas de yerba mate A) Enraizamiento en %, B) Número promedio de raíces por estaca C) Longitud de raíces promedios D) Número de estacas con raíces secundarias.

La adición del flavonoide quercetina previo a la inducción con IBA mejoró en su conjunto el sistema de raíces lo que posibilitará un rápido crecimiento de las yemas

presentes en las estacas y con esto se logrará una planta (Clon) en buenas condiciones para ser llevado al campo (Fig. 19).



Figura 19. Respuestas de distintos tipos de inducción a las 35 de días. A) Tratamiento control; B) Quercetina y C) Quercetina más IBA. La barra indica 5 cm.

Considerando la influencia de las sustancias fenólicas en curso del proceso de enraizamiento y la delimitación de las fases del mismo por los picos de actividad de enzimas POX, se evaluó los cambios de actividad a distintos tiempos desde la inducción en tres tratamientos diferentes. 1) Control; 2) Quercetina y 3) Quercetina más IBA. El tratamiento Quercetina y Quercetina más IBA produjo una disminución de la actividad inicial hasta el día 4 respecto al tratamiento control. Luego del cuarto día las actividades específicas de POX en el tratamiento Quercetina más IBA fue siempre inferior a la medida de la actividad en los tratamientos sin hormona (Fig. 20). Varios trabajos han explicado que la actividad de enzimas peroxidasa (EC 1.11.1.7) incrementa con la pérdida de la capacidad de enraizamiento, siendo este comportamiento opuesto a la concentración o patrón mostrados por la formas libres de auxinas (Aumond *et al.* 2017).

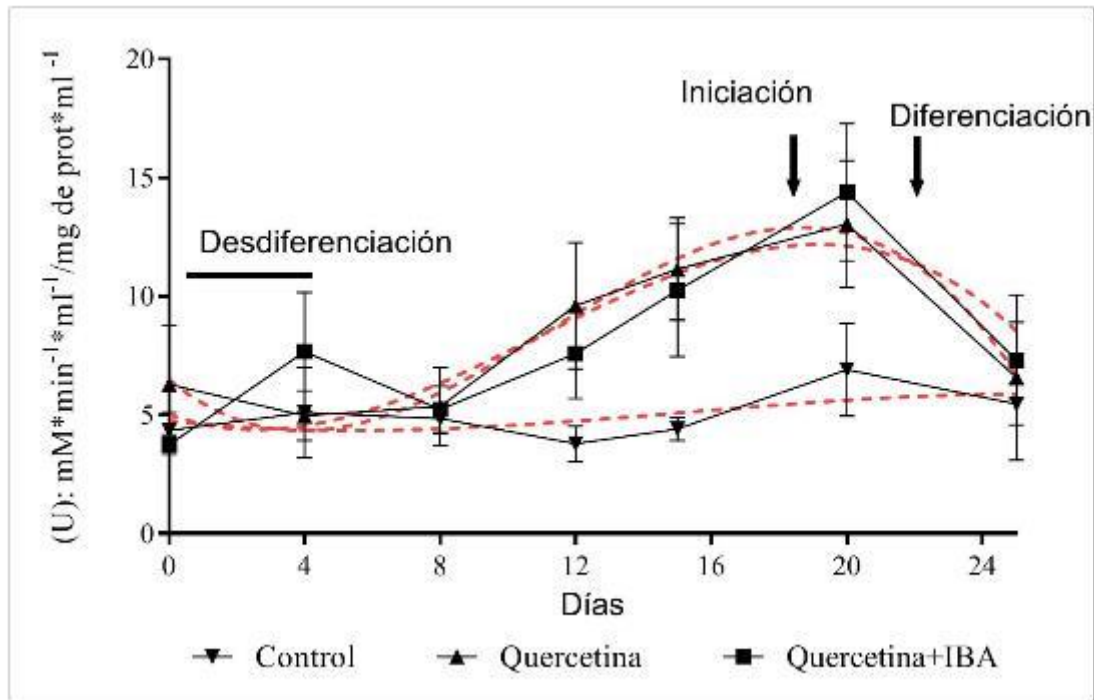


Figura 20. Efecto de la actividad peroxidasa en el curso del enraizamiento adventicio de estacas de yerba mate con distintos tratamientos inductivos. Las líneas punteadas representan la curva de ajuste utilizando un polinomio de tercer orden.

El patrón de comportamiento de enzimas asociadas al estrés oxidativo como POX es utilizado desde hace años como marcador del proceso de rizogénesis adventicia (Fett-Neto *et al.* 1992; Schwambach *et al.* 2008) e inclusive para la separación de las fases que componen el mismo como fuera explicitado en el capítulo anterior. Asimismo la descripción de su comportamiento y asociación con el proceso de rizogénesis adventicia no es del todo clara, aunque hay una aceptación de la asociación entre el decrecimiento de la actividad de POX durante las fases de desdiferenciación, un incremento en la fase de iniciación y un decrecimiento en la fase de expresión (Nag *et al.* 2001; Rout 2006; Zanoni do Prado *et al.* 2015). En este sentido la disminución de la actividad de POX inicial y el incremento posterior observado estaría correlacionado con un aumento de las formas libres de auxinas al principio y una disminución posterior coincidente con el incremento de la actividad de las POX, y este patrón con la mayor tasa de enraizamiento en el tratamiento Quercetina más IBA, hecho similar a lo que ocurre en *Eucalyptus globulus*, en el que la actividad peroxidasa se relaciona de forma inversa a la capacidad de enraizamiento (Aumond *et al.* 2017). El comportamiento de la curva de POX en el tratamiento control (IBA solo) podría estar explicado por una mecanismo de inhibición

del complejo enzimático por la falta de sustrato lo que conduce a la enzima a una ruta inhibitoria.

Consideraciones finales del capítulo

Estos resultados permiten concluir que el diámetro de las estacas, el estado fisiológico de la planta madre y el tratamiento inductivo son condicionantes a la hora de tener éxito en el enraizamiento adventicio de esquejes de yerba mate.

El diámetro de la estaca condiciona el éxito del proceso de enraizamiento; estacas con diámetros mayores a 5 mm no enraízan ni brotan con facilidad. La condición fisiológica más determinante en el éxito del tratamiento inductivo es el contenido de sustancias fenólicas, las cuales se relacionan inversamente al porcentaje de enraizamiento por una falta de control en la oxidación de las misma que causa el ennegrecimiento y muerte de la estacas antes de que se produzca la rizogénesis adventicia.

La adición de un tipo determinado de flavonoide (Quercetina) previo a la inducción del enraizamiento mejora el porcentaje de enraizamiento y la calidad de sistema de raíces formado. En este sentido la inducción con IBA y el pretratamiento con Quercetina influiría también en la actividad de peroxidasas produciendo una disminución inicial de su actividad, seguido de un incremento lo que posiblemente un incremento de las formas libres de auxinas en la fase de desdiferenciación lo que explicaría la mejora en el enraizamiento.

**CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES,
CONSIDERACIONES FINALES Y
PERSPECTIVAS FUTURAS**

Conclusiones

La rizogénesis adventicia de vástagos *in vitro* y de esquejes plurinodales de yerba mate no presentan limitaciones físicas en el crecimiento del primordio de raíz, aunque sí orígenes diferentes según se trate de vástagos *in vitro* (parénquima floemático) o estacas plurinodales (cambium vascular) y ésta diferencia en orígenes, según distintos métodos de propagación y explantes se deberían a la capacidad de desdiferenciación de las células presentes en tejidos de distintas edades y su respuesta a la señal de auxina.

En el enraizamiento *in vitro*, y durante la fase de inducción es necesario un incremento en la concentración de boro la cual es estrictamente necesaria para el proceso de rizogénesis adventicia, y su incremento respecto a la concentración normal de MS produce mejoras en la respuesta al enraizamiento.

Los estudios histológicos permitieron establecer la duración de las diferentes etapas del proceso rizogénico *in vitro* de vástagos de yerba mate y además identificar las células a partir de las cuales se originan los primordios radicales estableciendo que la banda de fibras presentes en el tallo no constituyen un obstáculo que impida la emergencia de las raíces adventicias.

El contenido de fenoles en las plantas dadoras de esquejes limita la respuesta a la rizogénesis, independientemente del genotipo o edad de la planta por propiciar la muerte oxidativa de los esquejes antes de que el proceso de rizogénesis tenga lugar. En este sentido las condiciones de crecimiento de las plantas dadoras de esquejes bajo reducida radiación permite mejorar sustancialmente la tasa de enraizamiento y sobrevivencia de estacas como consecuencia de una reducción del contenido de fenoles totales lo cual determinará una menor oxidación.

Si bien es conocida la disminución de la respuesta rizogénica en plantas adultas debido a la maduración y el cambio de fase, la respuesta al enraizamiento en individuos adultos no se correlacionaría con la edad sino con el cultivar, lo cual permitió determinar cultivares contrastantes en lo referido a su capacidad de enraizamiento.

Consideraciones finales

A partir de los resultados experimentales obtenidos de esta tesis, se cuenta con argumentos válidos para la implementación de un protocolo de propagación de cultivares de yerba mate.

La validación de la misma sienta sus bases en el cumplimiento de los objetivos parciales propuestos, los que son expuestos en los diferentes capítulos que conforman esta tesis.

En una etapa previa se determinó la importancia de la hoja en el enraizamiento adventicio de estacas de diversos cultivares de yerba mate obtenidas a partir de plantas adultas que crecían en condiciones de campo, y a partir del cual se plantearon los objetivos de la presente tesis (Capítulo I). Posteriormente se evaluaron, *in vitro*, la necesidad de boro y la concentración de sacarosa en las fases de inducción y expresión al enraizamiento, como así también la duración óptima de la inducción con ácido indolbutírico. Un punto especial merece la puesta a punto de la medición de la actividad de enzimas peroxidasas en tejidos de yerba mate ya que la misma requirió ajustar el sustrato, el pH de la mezcla de reacción y de la utilización de sustancias antioxidantes en el preparado de solución enzimática. En este sentido el ajuste del boro, la sacarosa, el tiempo de inducción con la hormona auxínica, y el ajuste de la metodología de medición de enzimas peroxidasas, permitió realizar la separación de las fases en el curso del enraizamiento adventicio según los picos de actividad peroxidasas y se corroboró con los análisis histológicos (Capítulo II).

El estudio del enraizamiento de macro estacas permitió conocer la relación negativa entre el contenido de fenoles totales en las plantas dadoras de estacas y la capacidad de enraizamiento, a su vez el contenido de fenoles totales estaría altamente relacionados a las condiciones ambientales en las que crece la planta y correlacionada positivamente con la radiación fotosintéticamente activa. Otros factores como ser, el diámetro de las estacas utilizadas, la adición de un tipo particular de flavonoide y la medición de enzimas peroxidasas en el curso del enraizamiento adventicio permitieron ajustar un procedimiento de clonación de cultivares adultos de yerba mate mediante la utilización de macro estacas (Capítulo III).

Finalmente los resultados obtenidos en el presente trabajo, contribuyen significativamente al avance en el conocimiento de la rizogénesis adventicia en la yerba mate, como un método de clonación que permita la propagación de cultivares con características superiores de producción y tolerancias a factores bióticos y abióticos.

A través de la experimentación realizada en ésta tesis se ha podido establecer algunos de los factores que se deberían considerar a la hora de impulsar un programa de clonación de cultivares con características superiores. En este sentido el estudio de las respuestas en la capacidad de enraizamiento evaluada en diferentes cultivares adultos de yerba mate y su discriminación en distintas escalas (fáciles y difíciles) sería la base fundamental en una primera evaluación de un programa de mejoramiento.

En la optimización del enraizamiento de estacas de árboles adulto de yerba mate se debería considerar la elección de individuos con alta capacidad de enraizamiento, el crecimiento de las ramas dadoras de estacas bajo reducida radiación solar, una nutrición de elementos minerales balanceada y el pre tratamiento de las estacas con Quercetina 500 μ molar por 1 hora, y la inducción con una solución de IBA 4000 ppm, en solución alcohólica por 5 minutos.

Perspectivas futuras

Finalmente, asumiendo que los resultados del presente trabajo contribuyen significativamente al avance de los conocimientos relacionados con el desarrollo de un sistema de clonación en yerba mate, el mismo también podría servir de base para abordar futuras líneas de trabajo relacionada al conocimiento de la expresión/ represión de genes que codifican proteínas candidatas en ser las responsables de recibir la señalización de parte de la hormona auxínica empleada y que desencadenan la respuesta inductiva del enraizamiento. Asimismo una segunda línea de trabajo podría incluir el estudio en los cultivares contrastantes evaluados en esta tesis y su comportamiento al rejuvenecimiento mediante sucesivas cascadas de enraizamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, M.; Oliveros Valenzuela, M. R.; Nicolás, C.; Sánchez Bravo, J. 2009. Rooting of carnation cuttings. The auxin signal. *Plant Signaling and Behavior* 4: 234-236.
- Altamura, M. 1996. Root histogenesis in herbaceous and Woody explants cultured *in vitro*. A critical review. *Agronomie* 16: 589-602.
- Alscher, R. G.; Erturk, N.; Heath, L. S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal Experimental Botany* 53:1331-1341.
- Assis, T. 2001. Evolution of technology for cloning Eucalyptus in large scale. En: Developing the *Eucalypt* of the Future. IUFRO International Symposium, Valdivia, Chile. CD-ROM communication, pp 1–16.
- Assis, T.; Fett-Neto, A.; Alfenas, A. 2004. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis in *Eucalyptus*. En: Walter C, Carson M (Eds.) *Plantation Forest Biotechnology for the 21th Century*. Research Signpost. Kerala, India. Págs. 303-333.
- Aumond M.; de Araujo A.; De Oliveira Junkes C.; de Almeida M.; Matsuura H.; de Costa F.; Fett-Neto AG. 2017. Events Associated with Early Age-Related Decline in Adventitious Rooting Competence of *Eucalyptus globulus* Labill. *Frontiers in Plant Science*. 8: 1734.
- Awang, Y.; Rahman, N. A.; Sandrang, A K. 2009. Adventitious rooting in microcuttings of selected indigenous Landscape trees of Malaysia. *International Journal of Agriculture and Biology* 11: 419–424.
- Ballester, A.; San-José M. C.; Vidal, N.; Fernández-Lorenzo, J.; Vieitez, A. 1999. Anatomical and biochemical events during *in vitro* rooting of micro cuttings from juvenile and mature phases of chesnut. *Annals of Botany* 83: 619-629.
- Bania, I.; Mahanta, R. 2012. Evaluation of peroxidases from various plant sources. *International Journal of Scientific and Research Publications* 2:1-5.
- Battista, F. D.; Maccario, D.; Beruto, M.; Grauso, L.; Lanzotti, V.; Curir, P.; Monroy, F. 2019. Metabolic changes associated to the unblocking of adventitious root formation in aged, rooting-recalcitrant cuttings of *Eucalyptus gunnii* Hook. f. (Myrtaceae). *Plant Growth Regulation* 89:73-82.
- Bellini, C.; Pacurar, D.; Perrone, I. 2014. Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annual Review of Plant Biology* 65: 639-666.

- Berthon, J.; Maldiney, R.; Sotta, B.; Gaspar, T.; Boyer, N. 1989. Endogenous level of growth regulators during the course of adventitious rooting in cuttings of *Sequoiadendron giganteum in vitro*. *Biochemistry Physiology Pflanz*. 184: 405-412.
- Blazich, F. 1988. Mineral nutrition and adventitious rooting. En. Adventitious Rooting Formation in Cuttings. Advances in Plant Sciences Series Vol. 2. Eds. T. Davis, B.E. Haissig and N. Sankhla. Dioscorides Press, Portland pp. 61–69.
- Bosa, N.; Calvete, E.; Nienow, A.; Suzin, M. 2003. Rooting and acclimatization of micropropagated *Gypsophila paniculata* plants. *Horticultura Brasileira* 21: 207-210.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bray, E.; Bailey-Serres, J.; Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. En: Buchanan B, Gruissem W, Jones R (Eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologists, Rockville (USA), pp 1158-1203.
- Brondani, G. E.; Baccarin, F. J. B.; Bergonci, T.; Goncalves, A. N.; Almeida, M. 2014. Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii*: efeito do genotipo, IBA, zinc, boro e coletas de brotações. *Cerne* 20:147-156.
- Burgess, D.; Hendrickson, O.; Roy, L. 1990. The importance of initial cutting size for improving the growth performance of *Salix alba* L. *Scandinavian Journal of Forest Research* 5 (1–4): 215–224.
- Camacho-Cristóbal, J.; Rexach, J.; González-Fontes, A. 2008. Boron in plants: Deficiency and toxicity. *Journal of Integrative Plant Biology*. Vol 50, 10: 1247-1255.
- Caso, O.; Dotta, L. 1997. Clonal propagation by rooting of cutting of *Ilex paraguariensis* and the stimulant effect of 4-chloro resorcinol. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata* 102: 91-95.
- Castiglione, S.; Franchin, C.; Fossati, T.; Lingua, G.; Torrigiani, P.; Biondi, S. 2007. High zinc concentrations reduce rooting capacity and alter metallothionein gene expression in white poplar (*Populus alba* L. cv. Villafranca). *Chemosphere* 67:1117-1126.

- Chattopadhyay, K.; Mazumdar S. 2000. Structural and Conformational Stability of Horseradish Peroxidase: Effect of Temperature and pH. *Biochemistry* 39: 263-270.
- Collet, G.; Le C.; Nowbuth, L. 1994. Comparison of the easy-to-root Jork 9 and Cepiland and the difficult-to-root EMLA 9 and Lancep *Malus* M9 rootstocks *in vitro*. *Advances in Horticultural Sciences* 8: 45-48.
- Compton, M.; Preece, J. 1986. Exudation and plant establishment. *NewsLetter* 50:9-18.
- Cortezzi-Graca, M.; Cooper, M.; Rodriguez Tabares, F.; Carpanezzi, A. 1988. Estaquia da erva-mate. *EMBRAPA Brasil, Circular Técnica* Nº. 18. Curitiba. Brasil 6 pp.
- Croteau, R.; Kutchan, T.; Lewis, N. 2000. Natural products (secondary metabolites). En: Jones R, Buchanan B, Gruissem W (Eds) *Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Biologists*, Rockville, pp 1250–1318.
- Crozier, A.; Kamiya, Y.; Bishop, G.; Yokota, T. 2000. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. En: Buchanan B B, Gruissem W, Jones R L. (Eds). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists*, Rockville, pp 850-929.
- Curir, P.; Van Sumere, C.; Termini, A.; Barthe, P.; Marchesini, A.; Dolci, M. 1990. Flavonoid accumulation is correlated with adventitious root formation in *Eucalyptus grunni* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. *Plant Physiol* 92: 1148-1156.
- Da Costa, C.; De Almeida, M. R.; Ruedell, G.; Schwambach, J.; Maraschin, F.; Fetto Netto A. 2013. When stress and development GO hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in Plant Science* 4: 127-133.
- Dang, J.; Kumaria, S.; Kumar, S.; Pramod, T. 2011. Micropropagation of *Ilex khasiana*, a critically endangered and endemic holly of Northeast India. *AoB Plants* doi:10.1093/aobpla/plr012.
- Davies, F.; Geneve, R.; Wilson, S. 2017. *Hartmann & Kester's Plant Propagation: Principles and Practices*, 9th Edition. ISBN-10: 0134480899 Pearson 1024 pp.
- Day, J.; Loveys, B. 1998. Propagation from cuttings of two woody ornamental Australian shrubs, *Boronia megastigma* Nees (brown boronia) and *Hypocalymma angustifolium* Endl. (white myrtle). *Australian Journal Experimental Agriscense* 38: 201-206.

- De Almeida, M. R.; Aumond, M.; Da Costa, C. T.; Schwambach, J.; Ruedell, C. M.; Correa, L. R.; Fett-Neto, A. G. 2017. Environmental control of adventitious rooting in *Eucalyptus* and *Populus* cuttings. *Trees* 31:1377-1390.
- De Klerk, G.; Keppel, M.; Ter Brugge, J.; Meekes, H. 1995. Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcuttings. *Journal of Experimental Botany* 46: 965-972.
- De Klerk, G.; Krieken, W.; Jong, J. 1999. The formation of adventitious roots new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 35: 189-199.
- Dharmasiri, N.; Estelle, M. 2004. Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends in Plant Science* 9: 302-308.
- Díaz-Pérez, J.; Shackel, K.; Sutter, E. 1995. Effects of *in vitro*-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120: 435-440.
- Díaz-Sala, C. 2014. Direct reprogramming of adult somatic cells toward adventitious root formation in forest tree species: the effect of the juvenile–adult transition. *Frontiers in plant Science* 5: 1-8.
- Dick, J.; Leakey, R. 2006. Differentiation of the dynamic variables affecting rooting ability in juvenile and mature cuttings of cherry (*Prunus avium*). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 81: 296-302.
- Dick, J.; Dewar, R. 1992. A mechanistic model of carbohydrate dynamics during adventitious Rooting development in leafy cuttings. *Annals of Botany* 70: 371-377.
- Di Rienzo J.; Casanoves F.; Balzarini M.; Gonzalez L.; Tablada M.; Robledo C. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Druege, U. 2009. Involvement of carbohydrates in survival and adventitious root formation of cutting within the scope of global horticulture. En: Niemi K, Scagel (Eds.) *Adventitious Root Formation of Forest Trees and Horticultural Plants – From Genes to Application*. Research Singpost. Kerala, India. Pp: 187-208.
- Ermel, F.; Vizoso, S.; Charpentier, J.; Jay-Allemand, C.; Catesson, A.; Couée, I. 2000. Mechanisms of primordium formation during adventitious root development from walnut cotyledon explants. *Planta* 211: 563-574.

- Esau, K. 1977. *Plant Anatomy*. John. Wiley, New York. 735 pp.
- Faivre-Rampant, O.; Charpentier, J.; Kevers, C.; Dommes, J.; van Onckelen, H.; Jay-Allemand, C.; Gaspar T. 2002. Cuttings of the non-rooting *rac* tobacco mutant over accumulate phenolic compounds. *Functional Plant Biology* 29: 63-71.
- Fett-Neto, A.; Teixeira, S.; Da Silva, A.; Sant' Anna, R. 1992. Biochemical and morphological changes during in vitro rhizogenesis in cuttings of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. *Journal Plant Physiology* 140, 720–728.
- Filip, R.; López, P.; Coussio, J.; Ferraro, G. 1998. Mate Substitutes or adulterants: Study of Xanthine content. *Phytotherapy Researcher* 12: 129-131.
- Filip, R.; López, P.; Giberti, G.; Coussio, J.; Ferraro, G. 2001. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia* 72: 774-778.
- Foster, G.; Stelzer, H.; McRae, J. 2000. Loblolly pine cutting morphological traits: effects on rooting and field performance. *New Forest* 19 3: 291-306.
- Frizon, C.; Oliveira, G.; Perussello, C.; Peralta-Zamora, P.; Camlofski, A.; Rossa, U. 2015. Rosemary Hoffmann-Ribani Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. *Food Science and Technology* 60: 795-801.
- Gaspar, T.; Penel, C.; Thorpe T.; Greppin, H. 1982. Peroxidases 1970–1980: A Survey of their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants. University of Geneva Press, Switzerland.
- Gaspar, T.; Franck, T.; Bisbis, B.; Kevers, C.; Jouve, L.; Hausman, J.; Dommes, J. 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37 (3): 263-285.
- Geneve, P.; Mokhtari, M.; Hackett, W. 1991. Adventitious Root Initiation In Reciprocally Grafted Leaf Cuttings from the Juvenile and Mature Phase of *Hedera helix* L. *Journal of Experimental Botany* 42(1): 65-69.
- Gonin, M.; Bergougnot, V.; Nguyen T.; Gantet, P.; Champion, A. 2019. What Makes Adventitious Roots?. *Plants* 8, 240.
- Gonzalez, A.; Cristóbal, C. 1997. Anatomía y ontogenia de semillas de *Helicteres lhotzkyana* (Sterculiaceae). *Bonplandia* 9: 287-294.
- Gortari, J. 1997. *EMBRAPA* Brasil, Documentos 33: 26-47.
- Greenwood, M. S. 1995. Juvenility and maturation in conifers: current concepts. *Tree Physiology* 15: 433-438.

- Greenwood, M. S.; Hopper, C. A.; Hutchison, K. W. 1989. Maturation in larch. I Effect of age on shoot growth, foliar characteristics and DNA methylation. *Plant Physiology* 90: 406-412.
- Gregianini, T.; Winge, H. 2000. Variabilidade de proteínas de reserva em populações naturais de ervamate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae). En: Congresso sul-americano de Erva Mate, 3, Encantado. Anais. Porto Alegre: Edição dos Organizadores pp 373-380.
- Hackett, W. P. 1987. Juvenility and maturity. En: Bonga J. M.; Durzan, D. J. (Eds). Cell and Tissue Culture in Forestry Science, vol 24-26. Springer, Dordrecht, pp 216-231.
- Haissig, B.; Davis, T.; Riemenschneider, D. 1992. Researching the controls of adventitious rooting. *Physiologia Plantarum* 84: 310-317.
- Haissig, B.; Davis, T. 1994. A Historical evaluation of adventitious rooting research to 1993. En Biology of adventitious root formation. Davis TE, Haissig B. E. (Eds.). Plenum Press, New York and London pp 275-331.
- Hansch, R.; Mendel, R. R. 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology* 12:259-266.
- Hansen, J. 1990. Influence of cutting position and temperature during rooting on adventitious root formation and axillary bud break of *Stephanotis floribunda*. *Scientia Horticulturae* 40: 345-354.
- Hartmann, H.; Kester, D.; Davies, F.; Geneve, R. 2002. Plant propagation: principles and practices, 7^{ma} Edición. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ. 880 pp.
- Hatzilazaroua, S.; Syrosa, T.; Yupsanisb, T.; Bosabalidisc, A.; Economoua, A. 2006. Peroxidases, lignin and anatomy during *in vitro* and *ex vitro* rooting of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) microshoots. *Journal of Plant Physiology* 163: 827-836.
- Heck, C.; Demejia, E. 2007. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *Journal of Food Science* 72: 9.
- Hicks, G. 1987. Adventitious rooting of apple microcutting *in vitro* and anatomical study. *Canadian Journal of Botany* 65: 1913-1920.

- Horbach, A. M. 2008. *In vitro* and *ex vitro* propagation of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae). Tesis para Optar al Grado de Magíster. Universidad Nacional de Santa María. Santa María, Brasil. 52 págs.
- Huang, L.; Lius, S.; Huang, B. L.; Murashige, T.; Mahde, E.; Van Gundy, R. 1992. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks *in vitro*: model for phase reversal of trees. *Plant Physiology* 98: 166-173.
- Hung, C. D.; Trueman, S. J. 2011. Topographic effects differ between node and organogenic cultures of the eucalypt *Corymbia torelliana* x *C. citriodora*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 104:69-77
- Husen, A.; Pal, M. 2007. Effect of branch position and auxin treatment on clonal propagation of *Tectona grandis* Linn. F. *New Forests* 34: 223-233.
- INYM:http://www.inym.org.ar/inym/imagenes/Estadisticas/Estractos_por_has.pdf
- Jarvis, B. 1986. Endogenous control of adventitious rooting in non-woody cuttings. En: Jackson MB (Eds.). *New root formation in plant and cuttings*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp 191-222.
- Jarvis, B.; Ali, A.; Shaheed, A. 1983. Auxin and boron in relation to the rooting response and ageing of mung bean cutting. *New Phytologist* 95:509-518.
- Jasik, J.; De Klerk, G. 1997. Anatomical and ultrastructural examination of adventitious root formation in stem slices of apple. *Biological Plant* 39: 79-90.
- Johansen, D. A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw Hill Book Co. New York. 511 pp.
- Josten, P.; Kutschera, U. 1999. The Micronutrient Boron Causes the Development of Adventitious Roots in Sunflower Cuttings. *Annals of Botany* 84: 337-342.
- Kibbler, H.; Johnston, M.; Williams, R. 2004. Adventitious root formation in cuttings of *Backhousia citriodora* F. Muell. Plant genotype, juvenility and characteristics of cuttings. *Scientia Horticulturae* 102: 133-143.
- Koshiha, T.; Kobayashi, M.; Matoh, T. 2009. Boron nutrition of tobacco BY-2 Cells. V. Oxidative damage is the major cause of cell death induced by boron deprivation. *Plant Cell Physiol* 50: 26–36.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.

- Leakey, R.; Mohammed, H. 1985. Effects of stem length on root initiation in sequential single-node cuttings of *Triplochiton scleroxylon* K. Schum. *Journal Horticultural Science* 60: 431–437.
- Loomis, W.; Battaile, J. 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry* 5: 423-438.
- Lowell, P.; White, J. 1986. Anatomical changes during adventitious root formation. En: Jackson MB, (Eds.). *New root formation in plants and cuttings*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers pp 111-140.
- Luo, J.; Butelli, E.; Parr, A.; Niggeweg, R.; Bailey, P.; Weisshaar, B.; Martin, C. 2008. AtMYB12 regulates caffeoyl quinic acid and flavonol synthesis in tomato: expression in fruit results in very high levels of both types of polyphenol. *The Plant Journal* 56: 316-326.
- Luna, C.; Sansberro, P.; Mroginski, L.; Tarragó, J. 2003. Micropropagation of *Ilex dumosa* (Aquifoliaceae) in a tissue culture system. *BioCell* 27: 205-212.
- Luque, R.; Sousa, H.; Kraus, J. 1996. Métodos de coloracao de Roesse (1972) – modificado – e Kropop (1972) visando a substituzo do azul de astra por azul de alcito 8 GS ou 8 GX. *Acta Botanica Brasileria* 10: 199-212.
- Maathuis, F. J. M. 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 250-258.
- Majada, J. P.; Sánchez-Tamés, R.; Revilla, M. A.; Casares, A. 2000. Micropropagation of *Ilex aquifolium* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 36: 521-526.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2^{da} Edición. Academic Press, San Diego, 889 pp.
- Milrad De Forchetti, S. M.; Tigier, H. A. 1990. Indole-3-acetic acid oxidase and syringaldazine oxidase of peroxidase isozymes in soybean root nodules. *Physiol Plant*. 79: 327–330.
- Moncousin, C. 1991. Rooting of *in vitro* cuttings. En: Bajaj Y. P. S (Eds.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 17: High-Tech and Micropropagation I. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, pp 231-261.
- Moncousin, C.; Gaspar, T. 1983. Peroxidase as a marker for rooting improvement of *Cynara scolymus* L. cultured *in vitro*. *Biochem. Physiol. Pflanz*. 178: 263-271.

- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology* 25: 135-166.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nag, S.; Saha, K.; Choudhuri, M. 2001. Role of auxin and polyamines in adventitious root formation in relation to changes in compounds involved in rooting. *Journal Plant Growth Regulation* 20: 182-194.
- Nemeth, G. 1986. Induction of rooting. En: Bajaj Y. P. S. (Eds.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 1: Trees I*. Springer. Berlin Heidelberg 49-64 pp.
- Oberschelp, G. P. J.; Goncalves, A. N. 2016. Assessing the effects of basal media on the in vitro propagation and nutritional status of *Eucalyptus dunnii* Maiden. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 52:28-37.
- O'Brien, J. A.; Vega, A.; Bouguyon, E.; Krouk, G.; Gojon, A.; Coruzzi, G.; Gutierrez, R. A. 2016. Nitrate transport, sensing, and responses in plants. *Molecular Plant* 9:837-856.
- Oiwa, Y.; Kitayama, K.; Kobayashi, M.; Matoh, T. 2013. Boron deprivation immediately causes cell death in growing roots of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Soil Science and Plant Nutrition* 59: 621-627.
- Olesen, P. O. 1978. On cyclophysis and topophysis. *Silvae Genetica* 27: 173-178.
- OuYang, F.; Wang, J.; Li, Y. 2015. Effects of cutting size and exogenous hormone treatment on rooting of shoot cuttings in Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *New Forest* 46: 91-105.
- Palanisamy, K.; Kumar, P. 1997. Effect of position, size of cuttings and environmental factors on adventitious rooting in neem (*Azadirachta indica* A. Juss). *Forest Ecology and Management* 98: 277-280.
- Parr, A.; Loughman, B. 1983. Boron and membrane function in plants. En: *Metals and Micronutrients. Uptake and Utilization by Plants*. Eds. Robb DA, Pierpoint WS. 7. Academic Press, New York pp 87-10.
- Passardi, F.; Longet, D.; Penel, C.; Dunand, C. 2004. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry* 65 1879-1893.
- Pijut, P.; Woeste, K.; Michler, C. 2011. Promotion of adventitious root formation of difficult-to-root hardwood tree species. *Horticultural Reviews* 38: 213-251.

- Pizarro, A.; Díaz-Sala, C. 2019. Cellular dynamics during maturation-related decline of adventitious root formation in forest tree species. *Physiologia Plantarum* 165: 73-80
- Poethig, R. 1990. Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science* 250: 923-930.
- Pop, T.; Pamfil, D.; Bellini, C. 2011. Auxin control in the formation of adventitious roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 39:307-316.
- Rasmussen, A.; Mason, M. G.; Cuyper, C. D.; Brewer, P. B.; Herold, S.; Agusti, J. 2012. Strigolactones suppress adventitious rooting in *Arabidopsis* and pea. *Plant Physiology* 158: 1976-1987.
- Rasmussen, H.; Jensen, M.; Frampton, J.; Hansen-Møller, J.; Nielsen, U. 2019. Cloning by cuttings in Nordmann fir, *Abies nordmanniana*: hormonal characteristics in relation crown position, rooting competence, and orthotropism as ramets. 2019. *New Forests* <https://doi.org/10.1007/s11056-019-09759-0> 1 3
- Reisfeld, R.; Lewis, U.; Williams, O. 1962. Protein electrophoresis separation under acidic conditions. *Nature* 195: 281-283.
- Rey, H.; Mroginski, L. 1988. Regeneración de plantas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) por cultivo *in vitro* de ápices caulinares y de segmentos nodales. *Phyton* 48: 139-145.
- Ricci, A.; Carra, A.; Torelli, A.; Maggiali, C.; Morini, G.; Branca, C. 2001. Cytokinin-like activity of N,N'-diphenylureas. N,N'-bis-(2,3-methylenedioxyphenyl)urea and N,N'-bis-(3,4-methylenedioxyphenyl) urea enhance adventitious root formation in apple rootstock M26 (*Malus pumila* Mill.). *Plant Science* 160: 1055-1065.
- Ritchie, G. 1994. Commercial application of adventitious rooting to forestry. En: T. Davis y B. Haissig (Eds.), *Biology of adventitious root formation*. Plenum Press, New York, pp 37-52.
- Robards, K.; Prenzler, P.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* 66:401-436.
- Rout, G. R. 2006. Effect of auxins on adventitious root development from single node cuttings of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze and associated biochemical changes. *Plant Growth Regulation* 48: 111-117.

- Sánchez, C.; Vielba, J.; Ferro, E.; Covelo, G.; Solé Abarca, D.; De Mier, B.; Díaz-Sala, C. 2007. Two *SCARECROW-LIKE* genes are induced in response to exogenous auxin in rooting-competent cuttings of distantly related forest species. *Tree Physiology* 27: 1459-1470.
- San-José, M.; Vidal, N.; Ballester, A. 1992. Anatomical and biochemical changes during root formation in oak and apple shoots cultured *in vitro*. *Agronomie* 12: 767-774.
- Sansberro, P.; Rey, H.; Bernardis, A.; Luna, C.; Collavino, M.; Mroginski, L. 2000. Plant regeneration of *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae) by *in vitro* culture of nodal segments. *Biocell* 24: 53-63.
- Sansberro P.; Rey, H.; Mroginski, L.; Krivenki, M. 2001. Plant regeneration from *Ilex spp.* (Aquifoliaceae) *in vitro*. *Biocell* 25: 139-146.
- Sansberro, P.; Mroginski, L.; Bottini, R. 2004. Foliar sprays with ABA promote growth of *Ilex paraguariensis* by alleviating diurnal water stress. *Plant Growth Regulation* 42:105-111.
- Schwambach, J.; Fadanelli, C.; Fett-Neto, A. 2005. Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology* 25: 487–494.
- Schwambach, J.; Ruedell, C.; de Almeida, M.; Penchel, R.; de Araújo, E.; Fett-Neto, A. 2008. Adventitious rooting of *Eucalyptus globulus* × *maidennii* mini-cuttings derived from mini-stumps grown in sand bed and intermittent flooding trays: a comparative study. *New Forest* 36: 261–271.
- Singleton, V.; Rossi, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology and Viticulture* 16: 144-158.
- Smichovski, J. A. 1980. Efectos del ácido 3-indolbutírico sobre el enraizamiento de yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Tesina de Graduación para optar al grado de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE). 27 pp.
- Stefancic, M.; Stampar, F.; Veberic, R.; Osterc, G. 2007. The levels of IAA, IAAsp and some phenolics in cherry rootstock “GiSelA 5” leafy cuttings pretreated with IAA and IBA. *Scientia Horticulturae* 112: 399-405. doi:10.1016/j.scienta.2007.01.004
- Stefanos, P.; Syros, T.; Yupsanisb, T.; Bosabalidisc, A.; Economoua, A. 2006. Peroxidases, lignin and anatomy during *in vitro* and ex vitro rooting of gardenia

- (*Gardenia jasminoides* Ellis) microshoots. *Journal of Plant Physiology* 163: 827-836.
- Steffens, B.; Rasmussen, A. 2016. The physiology of adventitious roots. *Plant Physiol* 170: 603-617.
- Strader, L.; Bartel, B. 2011. Transport and metabolism of the endogenous auxin precursor indole-3-acetic acid. *Molecular Plant* 4: 477-486.
- Sun, Y.; Gao, G. L. 2013. Effects of different hormone on tissue culture of *Ilex crenata*. *Journal of Convergence Information Technology* 8: 763-771.
- Sun, Y.; Zhang, D.; Smagula, J. 2010. Micropropagation of *Ilex glabra* (L.) A. Gray. *HortScience* 45: 805-808.
- Tarragó J. 2001. Factores que afectan el enraizamiento de estacas de yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Tesina de Graduación para optar al grado de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE). 38 pp.
- Tarragó, J.; Sansberro, P.; Filip, R.; López, P.; Gonzalez, A.; Luna, C.; Mroginski L. 2005. Effect of leaf retention and flavonoids on rooting of *Ilex paraguariensis* cuttings. *Scientia Horticulturae* 103: 479-488.
- Tarragó, J.; Sansberro, P.; Mroginski, L. 2008. Actividad de enzimas peroxidadas durante la rizogénesis adventicia de estacas de yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). *Actas de la XXVII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal*. PX385 (253).
- Tate, H.; Page, T. 2018. Cutting propagation of *Santalum austrocaledonicum*: the effect of genotype, cutting source, cutting size, propagation medium, IBA and irradiance. *New Forest* 49: 551-570.
- Tognolli, M.; Penel, C.; Greppin, H.; Simon, P. 2002. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288: 129-138.
- Tschirsch, CA. 1979. Efectos de reguladores del crecimiento en el enraizamiento de estacas de yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Tesina de Graduación para optar al grado de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE). 28 pp.
- Vermerris, W.; Nicholson, R. 2008. The role of phenols in plant defense. En: Vermerris W, Nicholson R (Eds.) *Phenolic compound biochemistry*. Springer, New York, pp 211-234.

- Vieitez, A.; Vieitez, M. 1983. Secuencia de cambios anatómicos durante la rizogénesis *in vitro* del castaño. *Phyton* 43: 185–191.
- Vielba, J.; Díaz-Sala, C.; Ferro, E, Rico, S.; Lamprecht, M.; Abarca, D.; Ballester, A.; Sánchez, C. 2011. *CsSCL1* is differentially regulated upon maturation in chestnut microshoots and is specifically expressed in rooting-competent cells. *Tree Physiology* 31: 1152-1160.
- Waldenmaier, S.; Bünemann, G. 1992. *Ex vitro* effects in micropropagation of *Syringa L.* *Acta Horticulturae* 300: 201-209.
- Welander, M. 1983. *In vitro* rooting of the apple rootstock M.26 in adult and juvenile phases and acclimatation of plantlets. *Physiologia Plantarum* 58: 231-238.
- Wendling, I.; Trueman, S.; Xavier, A. 2014 a. Maturation and related aspects in clonal forestry- Part I: concepts, regulation and consequences of phase change. *New Forest* 45: 449-471.
- Wendling, I.; Trueman, S.; Xavier, A. 2014 b. Maturation and related aspects in clonal forestry- Part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. *New Forest* 45: 473-486.
- Wendt, S. 2005. Genética de populações em *Ilex paraguariensis* St. Hil. 165f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 165 pp.
- Wendt, S.; de Sousa Valderês, A.; Quoirin, M.; Sebbenn, A.; Mazza, M.; Sturion, J. 2007. Genetic characterization of provenances and progenies of *Ilex paraguariensis* St. Hil. by using RAPD markers. *Scientia Forestalis* 73: 47-53.
- Whetten. R.; MacKay, J.; Sederoff, R. 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 49: 585-609.
- Willmann, M.; Poethig, R. 2005. Time to grow up: the temporal role of small RNAs in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 548-552.
- Winge, W.; Wollheim, C.; Cavalli-Molina, S. 1995. Variabilidade genética em populações nativas de erva-mate e a implantação de bancos de germoplasma. En: Winge H, Ferreira A, Mariath, J. (Eds.). *Erva-mate: Biologia e cultura no cone Sul*. Porto Alegre: UFRGS, pp 323-345.
- Wu, G.; Poethig, R. S. 2006. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development* 133: 3539-3547.

- Wu, G.; Park, M.; Conway, S. R.; Wang, J.; Weigel, D.; Poethig, R. S. 2009. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* 138: 750-759.
- Xu, J.; Wang Y.; Zhang, Y.; Chai T. 2008. Rapid *in vitro* multiplication and *ex vitro* rooting of *Malus zumi* (Matsumura) Rehd. *Acta Physiologia Plantarum* 30: 129-132.
- Yaseen, M.; Ahmad, T.; Sablok, G.; Standardi, A.; Hafiz, I. A. 2013. Role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development (Review). *Molecular Biology Reports* 40 (4): 2837-2849.
- Zanoni do Prado, D.; Carvalho Dionizio, R.; Vianello, F.; Baratella, D.; Marques Costa, S.; Pace Pereira Lima, G. 2015. Quercetin and indole 3-butyric acid (IBA) as rooting inducers in *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*. *Australian Journal of Crop Science* 9 (11) 1057-1063.
- Zhou, J.; Wu, H.; Collet, G. 1992. Histological study of initiation and development *in vitro* of adventitious roots in mini-cuttings of apple rootstocks of M26 and EMLA9. *Physiologia Plantarum* 84: 433-440.
- Zimmerman, R.; Fordham, I. 1985. Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 110: 34-38.