

Establecimiento *in vitro* de Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) nativa de Uruguay

Ross Silvia¹, Arriaga María Emilia¹, Pechi Evelin¹

¹ Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Departamento de Biología Vegetal, Laboratorio de Fisiología Vegetal. Correo electrónico: sross@fagro.edu.uy

Recibido: 2016-11-10 Aceptado: 2017-05-08

Resumen

La yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) es una especie de gran importancia social y cultural en Uruguay, que presenta destacadas propiedades medicinales. Aunque en Uruguay no se planta a escala comercial, se encuentran poblaciones naturales de esta especie, que son un importante reservorio de diversidad genética. La propagación de la yerba mate es una limitante que debe ser resuelta para hacer posible cualquier actividad productiva o de conservación de este recurso genético. Las técnicas de cultivo *in vitro* permiten obtener un gran número de plantas relativamente uniformes a partir de poco material inicial, resultando en una mayor ganancia genética. La etapa inicial de establecimiento *in vitro* es limitante para la clonación, ya que generalmente hay un elevado porcentaje de pérdidas debidas a contaminación y oxidación de los explantos. En este trabajo se estudió la respuesta de materiales nativos de yerba mate procedentes de la Gruta de los Helechos (Tacuarembó), durante la etapa de establecimiento *in vitro*, comparándolos con un material comercial. Se evaluó el efecto de dos tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio (15 y 20 minutos) y el efecto de adicionar nitrato de plata al medio de cultivo en dos concentraciones (6 o 12 μ M). El agregado de nitrato de plata en el medio de cultivo redujo la contaminación bacteriana y la oxidación de los explantos, independientemente de la concentración empleada. El 70 % de los explantos de *I. paraguariensis* nativa sobrevivió la etapa de establecimiento *in vitro* y presentó yemas axilares que desarrollaron brotes.

Palabras clave: contaminación, micropagación, oxidación, nitrato de plata

Summary

***In vitro* Establishment of Native Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) from Uruguay**

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) is a species of great social and cultural importance in Uruguay, with outstanding medicinal properties. Although there are no commercial plantations in Uruguay, there are natural populations that represent a reservoir of genetic diversity for the species. The propagation of yerba mate is a limitation that must be solved to make possible any productive or conservationist activity of this genetic resource. *In vitro* culture techniques allow the production of a large number of relatively uniform plants from little starting plant material, resulting in a larger genetic gain. The initial stage of *in vitro* establishment is limiting for cloning, since there is generally a high percentage of losses due to contamination and oxidation of the explants. In this work the response of native yerba mate materials from Gruta de los Helechos (Tacuarembó, Uruguay) during the *in vitro* establishment stage was studied and compared with commercial plant material. The effect of two immersion times in sodium hypochlorite (15 and 20 minutes) and the effect of adding silver nitrate to the culture medium in two concentrations (6 or 12 μ M) were evaluated. The addition of silver nitrate to the culture medium reduced bacterial contamination and oxidation of the explants regardless of the concentration used. Seventy percent of the explants of native *I. paraguariensis* survived the *in vitro* establishment stage and new shoots developed from axillary buds.

Keywords: contaminación, micropagación, oxidación, nitrato de plata

Introducción

La yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) es una especie perteneciente a la familia Aquifoliaceae, ampliamente consumida en infusiones en el sur de América Latina, donde tiene gran importancia social y cultural. Numerosas publicaciones acerca de sus propiedades biomédicas y farmacológicas demuestran su efecto antioxidante, vasodilatador y antimutagénico entre otros (Bracesco et al., 2011). Uruguay es reconocido como el principal país consumidor de la infusión, aunque no cuenta con cultivos comerciales en su territorio (RAU, 2000). La especie se distribuye naturalmente en los bosques subtropicales del este de Paraguay, noreste de Argentina, sur de Brasil y Uruguay. En Uruguay, las poblaciones de yerba mate ocupan áreas de refugio de vegetación y alta riqueza específica, ubicadas en la zona este y noreste, representando el límite sur de distribución natural de la especie (Grela y Brussa, 2003; Giberti, 2011). Algunos autores indican que existe una gran distancia genética entre las poblaciones uruguayas y las del resto de su distribución natural presentando adaptaciones a ambientes que difieren sustancialmente de las áreas de producción comercial (Cascales et al., 2014), y constituyen un reservorio de variabilidad genética que puede resultar valioso o incluso imprescindible para la selección de materiales promisorios para nuestras condiciones climáticas (Giberti, 1995) a incluir en programas de mejoramiento y/o conservación de la especie.

Por tratarse de una especie alógama, la propagación vegetativa es una técnica de gran valor para la multiplicación de materiales selectos. Dicha práctica permite captar el componente aditivo y no aditivo de la varianza genética, resultando en mayores ganancias dentro de una misma generación de selección (Fielding, 1970). Asimismo, se obtiene mayor uniformidad de crecimiento, forma, características tecnológicas, y otras características deseables, y es posible estandarizar la producción y los usos del material vegetal. En otras especies se ha demostrado que la capacidad de propagación está controlada genéticamente y que existe variabilidad en las poblaciones naturales (Beyl y Trigiano, 2015). En Argentina y Brasil, existen numerosos trabajos publicados en los que se han evaluado diferentes alternativas para propagar vegetativamente plantas de yerba mate (Salas Pino y Laviosa, 1998; Sansberro et al., 1999, 2000; Sansberro, Mroginski y Bottini, 2000, 2001; Wendling, 2004; Tarragó et al., 2005, 2012; Dolce y Rey, 2006; Wendling et al., 2007, 2013; Dutra, Hansel y Wen-

dling, 2008; Horbach, 2008; Brondani et al., 2010; Dolce, Mroginski y Rey, 2010; Griebeler et al., 2014). Sin embargo, hasta el momento existen muy pocos estudios sobre las poblaciones silvestres de yerba mate uruguaya. El escaso conocimiento acerca de estos materiales, en particular de su capacidad de propagación, tanto por métodos vegetativos como a través de semillas, es una limitante importante para el mejoramiento y uso de germoplasma de yerba mate nativo.

La micropropagación es una técnica que resulta de gran interés práctico ya que permite producir plantas a partir de materiales seleccionados, cuando la propagación por semilla es difícil y se cuenta con poco material vegetal inicial (Zaniolo y Zanette, 2001). Para poder desarrollar un sistema de micropropagación, es fundamental estudiar todos los factores que inciden en la etapa de establecimiento *in vitro*, que pueden ser limitantes del proceso, en particular cuando se trata de especies leñosas (Bernasconi et al., 1996). Las mayores pérdidas en esta etapa se deben a la oxidación y/o contaminación de los explantes (Dutra y Silva, 2009). Generalmente, las especies leñosas presentan una alta carga endógena y exógena de agentes patógenos, que no son completamente removidos con los tratamientos de desinfección empleados habitualmente y proliferan durante el cultivo causando la muerte de los explantes. La oxidación u oscurecimiento de los tejidos cultivados *in vitro* es causada por radicales libres que oxidan diferentes componentes celulares, así como por la oxidación de compuestos fenólicos para producir quinonas, especies químicas muy reactivas que generan daños que pueden llevar a la muerte celular (Azofeifa, 2009). Los compuestos fenólicos se sintetizan en respuesta al estrés que genera el corte y son liberados al medio por las superficies cortadas. Algunos autores vinculan la oxidación con la acción del etileno, fitohormona gaseosa cuya biosíntesis es estimulada en condiciones de estrés (Liau et al., 1997; Ozden-Tokatli, Ozudogru y Akcin, 2005; Sarropoulou, Dimassi-theriou y Therios, 2016) y que promueve la acumulación de diversos metabolitos secundarios en los recipientes de cultivo (George, Hall y de Klerk, 2008). Este proceso de oxidación se acentúa cuando se emplean agentes desinfectantes en altas concentraciones o durante tiempos prolongados. Por eso resulta imprescindible ajustar tratamientos de desinfección que logren disminuir la contaminación sin dañar la capacidad de regeneración del explanto (Hartmann y Kester, 1998). El nivel de pérdidas en la etapa de establecimiento *in vitro* constituye una de las principales limitantes para la micropropagación, especialmente cuando los explantes provienen de

plantas leñosas creciendo a campo (Ramírez, León de Sierralta y Urdaneta, 1999).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la sobrevivencia, durante la etapa de establecimiento *in vitro*, de materiales de yerba mate nativos de Uruguay, como primera etapa para el desarrollo de un método de propagación *in vitro* de árboles nativos maduros de esta especie. Se compara la respuesta obtenida con plantas de una población nativa de la Gruta de los Helechos, en el departamento de Tacuarembó (NE de Uruguay), y plantas de un material comercial de origen policonal, frente a distintos niveles de dos agentes desinfectantes (hipoclorito de sodio y nitrato de plata).

Materiales y métodos

Material vegetal

Se cultivaron *in vitro* segmentos nodales con una o dos yemas axilares, obtenidos a partir de plantas madre de tres a cuatro años. Se utilizaron plantas madre obtenidas por semilla, de dos procedencias: plantas nativas de la Gruta de los Helechos (departamento de Tacuarembó, Uruguay) y plantas de una variedad comercial policonal del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Argentina. Los materiales fueron identificados como GH (procedencia Gruta de los Helechos) y C (procedencia comercial).

Las plantas madre se cultivaron en condiciones de invernadero durante los tres meses previos a la instalación del ensayo, a una temperatura constante de 24 ± 2 °C, y fueron podadas eliminando el brote apical para inducir la brotación de las yemas axilares.

Se realizaron aplicaciones foliares semanales de fungicida (Captan®, 0,2 %), fertilizante Phostrogen® [NPK(MgO₃-SO₃): 14-10-27(2,5-7,5)] y 8,8 mM Bencilaminopurina (BAP, Sigma B-3408; Sigma-Aldrich) (Sansberro, Mroginski y Bottini, 2005), para obtener explantos vigorosos y reducir la carga de patógenos.

Se colectaron brotes de 8 a 10 cm de largo, los cuales inmediatamente de colectados fueron inmersos en una solución antioxidante de polivinilpirrolidona (PVP al 1 %) para su traslado desde el invernáculo al laboratorio.

Tratamientos de desinfección

Los brotes se lavaron con agua corriente y detergente comercial (Deterjane®), se quitaron las hojas y se cortaron segmentos nodales con una o dos yemas axilares, de 1,0 a 1,5 cm de largo. Estos explantos se sumergieron en una solución de fungicida (Captan®, 0,5 %) durante 20 min, en

agitación. En la cámara de flujo laminar se colocaron en una solución de etanol 70 ° durante un minuto y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio (2 %). Se evaluó el efecto de dos tiempos de inmersión en la solución de hipoclorito de sodio: 15 y 25 minutos. Finalmente se realizaron dos enjuagues con agua destilada estéril y un tercer enjuague con una solución de ácido cítrico (0,1 %). Los explantos permanecieron inmersos en la solución de ácido cítrico hasta su siembra en el medio de cultivo.

Medio de cultivo

El medio de cultivo basal empleado fue MS (Murashige y Skoog, 1962) diluido cuatro veces (Rey et al., 1991), suplementado con vitaminas MS, sacarosa (3 %) y 0,44 µM BAP (Sansberro et al., 2000). Como agente gelificante se empleó agar (0,6 %) (Sigma A-4550; Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA). Se ajustó el pH en 5,80 previo al autoclavado a 121 °C durante 20 min. Se evaluó el efecto de agregar al medio nitrato de plata (AgNO₃) como agente desinfectante, en dos concentraciones: 6 y 12 µM.

Condiciones de cultivo

Los cultivos se incubaron en cámara de crecimiento a una temperatura de 24 ± 2 °C, 30 µmol de fotones m⁻²s⁻¹ de irradiancia y fotoperíodo 16:8; horas de luz y oscuridad respectivamente.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se empleó un diseño factorial 2 x 2 x 3, completamente aleatorizado, con dos materiales vegetales (comercial y nativo), dos tiempos de desinfección en hipoclorito de sodio al 2 % (15 y 25 minutos), y tres niveles de nitrato de plata agregado al medio de cultivo (0; 6 y 12 µM). Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento, empleando 10 explantos por repetición, para cada combinación de factores.

Durante 30 días se evaluó semanalmente la presencia de contaminación (hongo o bacteria), el número de explantos oxidados y la sobrevivencia, considerada como explantos que brotaron y que no presentaron síntomas de oxidación ni contaminación.

Se realizó el análisis de varianza y posterior comparación de medias (LSD) empleando el software estadístico InfoStat®, versión 2009 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), de acuerdo con el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha i + \beta j + \gamma k + \varepsilon_{ijk}$$

donde:

Y: variable dependiente

μ : media general

α : efecto del genotipo

β : efecto del tiempo de desinfección

γ : efecto del nitrato de plata

ε : error experimental.

Resultados y discusión

Ninguno de los dos materiales evaluados mostró diferencias significativas en el porcentaje de sobrevivencia *in vitro* ($p = 0,9240$). Sin embargo, las diferencias encontradas entre materiales en el porcentaje de oxidación y contaminación bacteriana sí fueron significativas. El nitrato de plata tuvo efecto significativo en el control de la contaminación bacteriana ($p < 0,0001$), la oxidación ($p < 0,0001$) y la sobrevivencia de los explantos ($p < 0,0001$) en la etapa de

introducción *in vitro*, pero no tuvo efecto en reducir la contaminación fúngica ($p = 0,0876$). No se encontraron diferencias significativas entre los dos tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio evaluados para las variables analizadas (Cuadro 1).

Efecto del material vegetal

Ambos materiales (C y GH) mostraron un porcentaje de sobrevivencia similar, superando el 50 % en la etapa de establecimiento *in vitro*. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la contaminación ($p < 0,0001$) y oxidación ($p < 0,0001$) de los explantos según el material vegetal. El material comercial (C), presentó un nivel de contaminación menor a 10 % (tanto por hongo como por bacteria) pero las pérdidas por oxidación fueron importantes (cerca de 25 %) y mayores a las observadas en el

Cuadro 1. Resumen del ANAVA para las variables contaminación con hongo y bacteria, oxidación y sobrevivencia de explantos de *Ilex paraguariensis* en la etapa de establecimiento *in vitro*. NaOCl: hipoclorito de sodio; AgNO₃: nitrato de plata; gl: grados de libertad, CV: coeficiente de variación

| Fuente de variación | gl | Valor p > F | | | |
|---------------------|----|-------------|--------|-----------|---------------|
| | | Bacteria | Hongo | Oxidación | Sobrevivencia |
| Material vegetal | 1 | <0,0001 | 0,5501 | <0,0001 | 0,924 |
| NaOCl | 1 | 0,356 | 0,1749 | 0,9152 | 0,3039 |
| AgNO ₃ | 2 | <0,0001 | 0,0876 | <0,0001 | <0,0001 |
| CV(%) | | 109,99 | 112,43 | 196,45 | 64,99 |
| Media | | 23,99 | 4,44 | 15,65 | 53,92 |

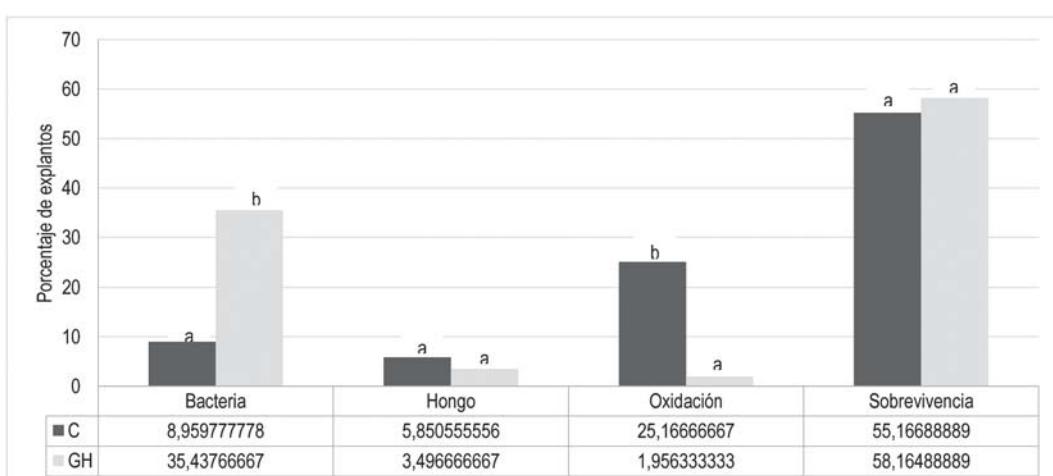


Figura 1. Sobrevivencia, oxidación y contaminación (con bacteria y hongo) de explantos de *I. paraguariensis* en la etapa de introducción *in vitro*. Se muestran los promedios por genotipo: C (material comercial), GH (material nativo procedente de la Gruta de los Helechos, Tacuarembó)

material de origen nativo (próximas al 2 %). Por otro lado, el material nativo (GH) mostró un alto porcentaje de contaminación bacteriana cuando no se agregó nitrato de plata al medio (35 %) y no mostró diferencias de contaminación fungica respecto al material comercial con ninguno de los tratamientos evaluados (Figura 1).

El material comercial se comportó de acuerdo a lo esperado para materiales seleccionados, provenientes de un programa de mejoramiento y cultivados en condiciones controladas, presentando bajos niveles de contaminación por hongo y/o bacteria. Por otro lado, era esperable que el material nativo presentara mayor carga de contaminantes, tanto fungicos como bacterianos, por tratarse de plántulas sin ningún tipo de manejo previo a su llegada al invernáculo. Sin embargo, la contaminación fungica fue baja (3,5 %) y no mostró diferencias significativas con el material comercial, posiblemente por efecto del pretratamiento con fungicida aplicado a las plantas madre. La contaminación bacteriana de origen endógeno es de más difícil erradicación y se manifestó cuando se cultivaron los explantos *in vitro*, en un medio rico en nutrientes y azúcar. Trabajos anteriores con yerba mate citan tasas de contaminación superiores al 90 % en esta etapa, empleando hipoclorito de sodio (1 %) durante 10 minutos (Dutra y Silva, 2009), e indican que la contaminación de origen endógeno es una de las principales causas de pérdida de explantos en la etapa de establecimiento *in vitro* de la especie (Bernasconi et al., 1996).

El diferente porcentaje de oxidación que mostraron los materiales evaluados puede estar dado por una diferente capacidad de síntesis o por una sensibilidad diferente a los efectos del etileno y los compuestos fenólicos que se originan frente a la condición de estrés generada por el corte, al separar los explantos de la planta madre (Azofeifa, 2009). Las especies que naturalmente contienen altos niveles de taninos como la yerba mate (Vieira et al., 2010) presentan mayor susceptibilidad a lo oxidación durante el cultivo *in vitro* (George, Hall y de Klerk, 2008). Sin embargo, la oxidación del tejido es muy dependiente del genotipo, en particular de los propios niveles endógenos de compuestos fenólicos de cada material, así como de su toxicidad, y muchas veces se encuentran diferencias entre especies del mismo género y también entre cultivares de una misma especie (Azofeifa, 2009). En varias especies, cuando las plantas madre crecen en oscuridad o con baja intensidad lumínica, se reducen los niveles de oxidación *in vitro*, ya que disminuye la actividad de las enzimas relacionadas con la biosíntesis y oxidación de los compuestos fenólicos (George, Hall y de Klerk, 2008). Si bien las plantas madre

del material GH estaban creciendo en invernáculo en las mismas condiciones que el material comercial (C), procedían de la regeneración natural dentro del monte, creciendo en condiciones de baja intensidad lumínica, y esto puede explicar los menores niveles de oxidación observados, además de las diferencias genéticas.

Efecto del nitrato de plata

El agregado de nitrato de plata en el medio de cultivo aumentó de manera significativa el promedio de sobrevivencia de ambos materiales vegetales en esta etapa, lográndose más de 70 % de explantos sobrevivientes, que desarrollaron yemas axilares vigorosas (Figura 2). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre las dos concentraciones de nitrato de plata evaluadas para ninguna de las variables estudiadas. La contaminación bacteriana y la oxidación de los explantos se redujeron significativamente cuando el nitrato de plata estaba presente en el medio, independientemente de la concentración empleada (6 o 12 μ M), resultando en mayores tasas de sobrevivencia. Sin embargo, en *Pistacia vera* (Ozden-Tokatli, Ozudogru y Akcin, 2005) y *Solanum tuberosum* (Alva Ticona y Oropeza, 2013) está reportado que concentraciones superiores a 12 μ M inhiben la proliferación de brotes *in vitro*. En otras especies (*Colobanthus quitensis*, *Sinningia speciosa*) se han obtenido resultados similares con el agregado de plata en forma de tiosulfato, el cual promueve la brotación de yemas axilares *in vitro* favoreciendo la regeneración (Cuba-Díaz et al., 2014).

Otros autores indican que el ion plata puede ser efectivo como agente antifúngico (Jo, Kim y Jung, 2009; Kim et al., 2012). Sin embargo, nuestros resultados



Figura 2. Brotación de yemas axilares de yerba nativa (GH), en la etapa de establecimiento *in vitro*, en medio MS diluido cuatro veces y en presencia de AgNO_3 6 μM .

no mostraron ningún efecto del agregado de nitrato de plata en reducir la contaminación fúngica en explants de *I. paraguariensis*.

El efecto del nitrato de plata en reducir la contaminación bacteriana y la oxidación fue diferente según el genotipo (Figuras 3 y 4).

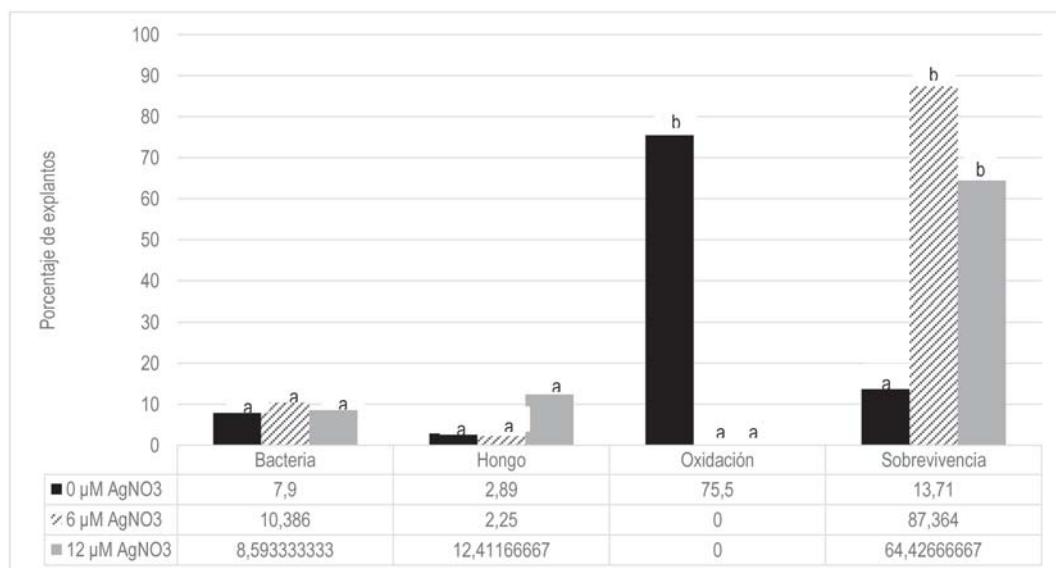


Figura 3. Efecto del nitrato de plata (0, 6 y 12 µM AgNO₃) en el porcentaje de contaminación (con bacteria y hongo), oxidación y sobrevivencia de explants de material comercial (C) de *I. paraguariensis* cultivados *in vitro*.

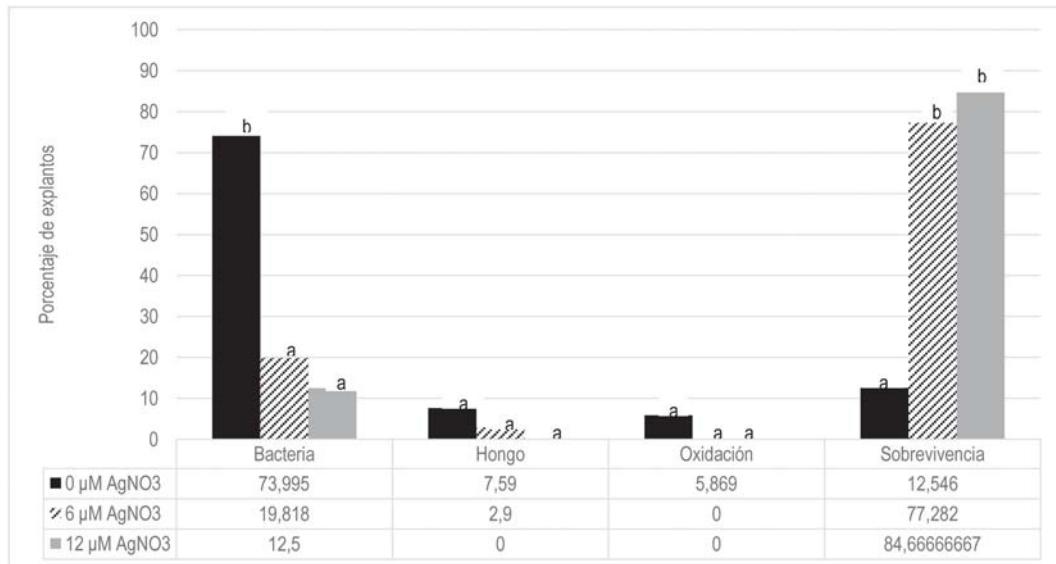


Figura 4. Efecto del nitrato de plata (0, 6 y 12 µM AgNO₃) en el porcentaje de contaminación (con bacteria y hongo), oxidación y sobrevivencia de explants de material nativo (GH) de *I. paraguariensis* cultivados *in vitro*.

Oxidación

El material comercial, no presentó una contaminación importante, pero sí una alta sensibilidad a la oxidación. En este material, el nitrato de plata redujo el efecto de los compuestos fenólicos de manera muy significativa mejorando la sobrevivencia de explants (Figura 3).

El ion plata es un potente antagonista capaz de inhibir un amplio rango de respuestas inducidas por el etileno (Goh et al., 1997). Esto puede explicarse por su efecto inhibidor de la acción del etileno, compitiendo por los receptores de esta hormona y disminuyendo la síntesis de metabolitos secundarios (George, Hall y de Klerk, 2008). Resultados similares se han encontrado en otras especies leñosas de los géneros *Pistacia* (Ozden-Tokatli, Ozudogru y Akcin, 2005), *Garcinia* (Goh et al., 1997) y *Prunus* (Sarropoulou, Dimassi-theriou y Therios, 2016) empleando nitrato o tiosulfato de plata como inhibidores competitivos del etileno, o inhibidores de su síntesis, como la aminoetoxivinilglicina (AVG). El empleo de otros agentes antioxidantes agregados al medio de cultivo, como carbono activado y L-cisteína no fue efectivo en reducir la oxidación de explantes de yerba mate cultivados *in vitro* (Mroginski et al., 1997).

Contaminación

El material nativo presentó una contaminación bacteriana mayor al 70 %. Fueron identificadas colonias de bacilos Gram positivos y Gram negativos (resultados no mostrados). El agregado de nitrato de plata redujo de manera significativa la presencia de bacterias, independientemente de la concentración empleada (6 o 12 μM) (Figura 4). Otros autores lograron un efectivo control de la contaminación bacteriana en *I. paraguariensis* e *I. dumosa* mediante el empleo de antibióticos o agentes biocidas (Luna et al., 2009, 2013).

Con el agregado de nitrato de plata (6 μM) puede evitarse el empleo de antibióticos, los cuales tienen solamente un efecto bacteriostático y además, por su alta especificidad, generalmente no previenen la proliferación de todos los microrganismos *in vitro*. Por otro lado, los antibióticos modifican la composición del medio de cultivo y pueden ser metabolizados por los explantes, por lo cual sólo deberían emplearse en casos excepcionales (Roca y Mroginski, 1991). El ion plata es altamente tóxico para varios microorganismos, entre los que se encuentran varias especies de bacterias, aunque aún no se conoce exactamente el modo de acción. Se ha propuesto que su fuerte efecto inhibitorio y bactericida puede estar explicado por la interacción de este ion con varias enzimas vitales, inactivándolas y también por los cambios que causa en la permeabilidad de las membranas, causando la muerte celular (Prabhu y Poulose, 2012).

Conclusiones

Fue posible establecer *in vitro* segmentos nodales de material de yerba mate nativo de Uruguay, obteniendo porcentajes de sobrevida superiores al 50 %. La incorporación de nitrato de plata al medio de cultivo resultó efectiva para reducir la contaminación bacteriana, sin necesidad de incorporar antibióticos al medio de cultivo. Asimismo, el agregado de esta sal resultó en una disminución de síntomas de estrés probablemente causados por la acumulación de etileno en el recipiente de cultivo.

Generalmente, un único método no es suficiente para controlar la oxidación de los explantes en la etapa de introducción, ya que es un problema complejo, regulado por múltiples factores. Sin embargo, el empleo de nitrato de plata 6 μM en el medio de cultivo fue suficiente para reducir completamente la oxidación de los explantes de ambos materiales vegetales (comercial y nativo), por lo tanto en yerba mate se pudo superar esta limitante incluyendo esta sal en el medio de cultivo.

Agradecimientos

Agradecemos al Ing. Agr. Andrés Berruti por su colaboración en la colecta de las plantas madre provenientes de la Gruta de los Helechos (departamento de Tacuarembó) y a los organizadores del VI Congreso Sudamericano de Yerba mate y II Simposio Sudamericano de Yerba mate y salud, en la persona del Dr. Nelson Bracesco, por proporcionarnos los ejemplares de yerba mate comercial empleados en este estudio.

Bibliografía

- Alva Ticona, S. y Oropeza, M. (2013). Effect of culture medium consistence and silver nitrate on micropropagation of two potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 55-62.
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Bernasconi, N., Mroginski, L., Sansberro, P. y Rey, H. (1996). Micropropagación de la Yerba mate: efecto del tipo de explante en el establecimiento de los cultivos *in vitro*. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 58(1-2), 23-31.
- Beyl, C. y Trigiano, R. (2015). *Plant propagation concepts and laboratory exercises*. Boca Ratón: CRC Press.
- Bracesco, N., Sanchez, A. G., Contreras, V., Menini, T. y Gugliucci, A. (2011). Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *Journal of Ethnopharmacology* 136(3), 378-384.
- Brondani, G. E., de Araujo, M. A., Wendling, I. y Kratz, D. (2010). Enraizamiento de miniestacas de Erva-Mate sob diferentes ambientes. *Pesquisa Florestal Brasileira*, (57), 29.

- Cascales, J., Bracco, M., Poggio, L. y Gottlieb, A. M. (2014). Genetic diversity of wild germplasm of «yerba mate» (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) from Uruguay. *Genetica*, 142(6), 563-73.
- Cuba-Díaz, M., Acuña, D., Cordero, C. M. y Klagges M. (2014). Optimización de parámetros para la propagación in vitro de *Colobanthus quitenensis* (Kunth) Bartl. *Gayana. Botánica*, 71(1), 58-67.
- Dolce, N. R. y Rey, H. Y. (2006). Cultivo in vitro de ápice de *Ilex paraguariensis*: Efecto del pretratamiento con medios líquidos sobre la brotación. Recuperado de <http://www.unne.edu.ar/unneviejaweb/cyt/cyt2006/05-Agrarias/2006-A-026.pdf>
- Dolce, N. R., Mroginski, L. A. y Rey, H. Y. (2010). Endosperm and endocarp effects on the *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Aquifoliaceae) seed germination. *Seed Science and Technology*, 38, 441-448.
- Dutra, L. F., Hansel, F. A. y Wendling, I. (2008). *Introdução ao cultivo in vitro de Erva-mate (Ilex paraguariensis)*. Colombo: Embrapa Florestas. (Embrapa Florestas. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 38).
- Dutra, L. F. y Silva, N. D. G. da. (2009). *Estabelecimento in vitro de Erva-mate (Ilex paraguariensis St. Hil.)*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. (Embrapa Clima Temperado. Comunicado técnico, 215).
- Fielding, J. M. (1970). Trees grown from cuttings compared with trees grown from seed (*Pinus radiata* D. Don). *Silvae Genetica*, 19(2-3), 54-63.
- George, E. F., Hall, M. A. y de Klerk, G. J. (2008). Plant growth regulators III: Gibberellins, ethylene, abscisic acid, their analogues and inhibitors, miscellaneous compounds. En E. F. George, M. A. Hall, G. J. de Klerk (Eds.). *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed. pp. 227-281). Dordrecht: Springer.
- Giberti, G. C. (1995). Aspectos oscuros de la corología de *Ilex paraguariensis* St. Hil. En H. Winge, A. G. Ferreira, J. E. de A. Mariath y L. C. Tarasconi (Eds.), *Erva-Mate: biología e cultura no Cone Sul* (pp. 289-300). Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Giberti, G. C. (2011). La «yerba mate» (*Ilex paraguariensis*) en tempranos escritos rioplatenses de Bonpland y su real distribución geográfica en sudaméricaustral. *Bonplandia*, 20(2), 203-212.
- Goh, C. J., Keng, S. K., Lakshmanan, P. y Loh, C. S. (1997). The role of ethylene on direct shoot bud regeneration from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) leaves cultured in vitro. *Plant Science*, 124(2), 193-202.
- Grela, I. y Brussa, C. (2003). Relevamiento florístico y análisis comparativo de comunidades arbóreas de Sierra de ríos (Cerro Largo - Uruguay). *Agrociencia (Uruguay)*, 7(2), 11-26.
- Griebeler, A. G., Consatti, G., de Freitas, E. M. y Sperotto, R. A. (2014). Optimal culture conditions for the initial development of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. explants. *Acta Botánica Brasileira*, 28(4), 548-551.
- Hartmann, H. T. y Kester, D. E. (1998). *Propagación de Plantas: Principios y Prácticas*. México: Compañía Editorial Continental.
- Horbach, M. A. (2008). *Propagación in vitro e ex vitro de Erva-mate (Ilex paraguariensis Saint Hilaire - Aquifoliaceae)* (Tesis de maestría). Universidad Federal de Santa María, Santa María.
- Jo, Y. K., Kim, B. H. y Jung, G. (2009). Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Disease*, 93(10), 1037-1043.
- Kim, S. W., Jung, J. H., Lamsal, K., Kim, Y. S., Min, J. S. y Lee, Y. S. (2012). Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology*, 40(1), 53-58.
- Liau, S. Y., Read, D. C., Pugh, W. J., Furr, J. R. y Russell, A. D. (1997). Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: Relationship to the antibacterial action of silver ions. *Letters in applied microbiology*, 25(4), 279-283.
- Luna, C., Acevedo, R., Collavino, M., González, A., Mroginski, L. y Sansberro, P. (2013). Endophytic bacteria from *Ilex paraguariensis* shoot cultures: Localization, characterization, and response to isothiazolone biocides. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 49(3), 326-332.
- Luna, C., Collavino, M., Sansberro, P. y Mroginski, L. (2009). Bacterial contamination in *Ilex dumosa* (aquifoliaceae) cultures: Antibiotic treatment. *Acta Horticulturae*, 812, 97-102.
- Mroginski, L., Sansberro, P., Regy, H. y Collavino, M. (1997). Micropropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) Estado actual y perspectivas En *I Congresso sul americano da erva-mate* (pp. 141-151). Colombo: EMBRAPA-CNPq.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Ozden-Tokatli, Y., Ozudogru, E. A. y Akcin, A. (2005). In vitro response of pistachio nodal explants to silver nitrate. *Scientia Horticulturae*, 106(3), 415-426.
- Prabhu, S. y Poulose, E. K. (2012). Silver nanoparticles: Mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2(1), 32.
- Ramirez, M., León de Sierralta, S. y Urdaneta, A. (1999). Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento in vitro de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Niedz. *Revista de facultad de agronomía (LUZ)*, 16: 243-255.
- RAU. 2000. *El mate*. Recuperado de <http://www.rau.edu.uy/uruguay/cultura/mate.htm>
- Rey, H. Y., Burtnik, O. J., Sansberro, P. A. y Mroginski, L. A. (1991). Medios de cultivo para el establecimiento in vitro de explantes de yerba mate. *Turrialba*, 41(3), 306-310.
- Roca, W. M. y Mroginski, L. A. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Colombia: CIAT.
- Salas Pino, P. y Laviosa, G. (1998). Multiplicación vegetativa de Yerba mate por estacas terminales. *Investigación Agraria*, 2(1), 28-31.
- Sansberro, P., Mroginski, L. y Bottini, R. (2000). *Gibberelinas y brotación de la Yerba Mate (Ilex paraguariensis St. Hil.)*. Recuperado de http://www.unne.edu.ar/unneviejaweb/cyt/cyt2000/5_agrarias/a_044
- Sansberro, P., Mroginski, L. y Bottini R. (2001). In vitro morphogenetic responses of *Ilex paraguariensis* nodal segments treated with different gibberellins and prohexadione-Ca. *Plant Growth Regulation*, 34(2), 209-214.
- Sansberro, P., Mroginski, L. y Bottini, R. (2005). Stimulation of lateral branch formation on *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) seedlings. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46, 707-710.
- Sansberro, P., Rey, H., Bernardis, A., Luna, C., Collavino, M. y Mroginski, L. (2000). Plant regeneration of *I. paraguariensis* by in vitro culture of nodal segments. *Biozell*, 24(1), 53-63.
- Sansberro, P., Rey, H., Mroginski, L. y Collavino, M. (1999). In vitro plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). *In Vitro Cellular & Development Biology - Plant*, 35(5), 401-402.
- Sarropoulou, V., Dimassi-theriou, K. y Therios, I. (2016). Effect of the ethylene inhibitors silver nitrate, silver sulfate, and cobalt chloride on micropropagation and biochemical parameters in the cherry rootstocks CAB-6P and Gisela 6. *Turkish Journal of Biology*, 40, 1-14.
- Tarragó, J., Filip, R., Mroginski, L. y Sansberro, P. (2012). Influence of the irradiance on phenols content and rooting of *Ilex paraguariensis* cuttings collected from adult plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(6), 2419-2424.

- Tarragó, J., Sansberro, P., Filip, R., López, P., González, A., Luna, C. y Mroginski, L. (2005). Effect of leaf retention and flavonoids on rooting of *Ilex paraguariensis* cuttings. *Scientia Horticulturae*, 103(4), 479-488.
- Vieira, M. A., Maraschin, M., Pagliosa, C. M., Podestá, R., de Simas, K. N., Rockenbach, I., ... y Amante, E. R. (2010). Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidant properties of mate (*Ilex paraguariensis*) residue. *Journal of Food Science*, 75(3), C280-C285.
- Wendling, I. (2004). *Propagação Vegetativa de Erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire): estado da arte e tendências futuras*. Colombo: EMBRAPA Florestas. (Documentos, 91).
- Wendling, I., Brondani, G. E., de Biassio, A. y Dutra, L. F. (2013). Vegetative propagation of adult *Ilex paraguariensis* trees through epicormic shoots. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 35(1), 117-125.
- Wendling, I., Santin, D., Roveda, L. F. y Orrutéa, A. G. (2007). Ambiente de enraizamento e substratos na miniestaquia de erva-mate. *Scientia Agraria*, 8(3), 257-267.
- Zaniolo, S. y Zanette, F. (2001). Micropropagação de Erva-mate a partir de segmentos nodais. *Scientia Agraria*, 2(1), 39-44.