

## Propagación clonal por enraizamiento de estacas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y su promoción por 4-clororesorcinol

OSVALDO H. CASO & LUIS A. DOTTA<sup>1</sup>

Centro de Ecofisiología Vegetal (CONICET). Serrano 669 1414 Buenos Aires

CASO O.H. & L.A. DOTTA. 1997. Propagación clonal por enraizamiento de estacas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y su promoción por 4-clororesorcinol. Rev. Fac. de Agronomía, La Plata 102(1): 91-95.

El enraizamiento de trozos de ramas separados de plantas cultivadas en invernáculo de un clon de yerba mate (*Ilex paraguariensis* L.) se obtuvo mediante el pretratamiento de su base con una solución 100 mM de 4-cloro-resorcinol durante dos horas. Para el enraizamiento de las estacas se empleó una mezcla en talco que contenía 1 % de ácido indol butírico, 1 % de 1-fenil-3-metil, pirazol-5-ona, 10 % de azúcar y 10 % de un fungicida. Al cabo de 45 días, las estacas de este tratamiento tenían un número mayor de raíces secundarias y una mayor longitud total del sistema radical comparadas con aquellas tratadas con la mezcla enraizante sin el pretratamiento. Las plantas logradas crecieron en el invernáculo.

**Palabras clave:** enraizamiento, *Ilex paraguariensis*, yerba mate, ácido indol butírico, 4-cloro resorcinol, 1-fenil-3-metil, pirazol-5-ona, PPZ

CASO O.H. & L.A. DOTTA. 1997. Clonal propagation by rooting of cutting of *Ilex paraguariensis* and the stimulant effect of 4-clororesorcinol. Rev. Fac. de Agronomía, La Plata 102(1): 91-95.

Rooting of stem segments of glasshouse-grown plants of *Ilex paraguariensis* L. when the base of the cuttings were treated for two hours with 100 mM 4-chlororesorcinol previously to applying a talc mixture of IBA, 1-phenyl,3-methyl, pyrazol-5-ona, sugar and a fungicide. An increase in the number of secondary roots as well as of the total root length was obtained after 45 days, compared to the response of those cuttings without the pre-treatment.

**Key words:** Rooting, *Ilex paraguariensis*, yerba mate, indol butiric acid, 4-chloro resorcinol, 1-phenyl, 3-methyl, pyrazol-5-ona, PPZ.

### INTRODUCCIÓN

La yerba mate (*Ilex paraguariensis* L.) se propaga, por lo general, por medio de semillas. Este sistema no facilita que exista una gran homogeneidad en los montes en explotación. En consecuencia, se ha desarrollado la técnica de propagación agámica, por enraizamiento de estacas separadas de indivi-

duos selectos. El tratamiento de ese material con mezclas comerciales, con base auxínica, aptas para promover la formación de raíces adventicias ha dado resultados aleatorios en distintos años (Navajas, com. pers.). Las causas pueden ser diversas, entre las cuales estaría el escaso mejoramiento genético de las variedades empleadas.

Como con toda planta leñosa, en el em-

<sup>1</sup> Becario de Establecimiento Las Marías (Gdor. Virasoro, Corrientes)

Recibido: 08/04/97. Aceptado: 10/08/97.

pleo de técnicas de propagación clonal se tropieza con la dificultad de clonar ejemplares adultos (Franclét, 1979). Es sabido que la capacidad de formar raíces adventicias es una característica del estado juvenil (Hackett, 1985; Caso, 1992; Howard, 1994). Al mismo tiempo, el material adulto separado de estas especies leñosas presenta una elevada cantidad de fenoles. Esos fenoles muestran un incremento importante al cortarse los trozos de ramas, como consecuencia de los daños celulares (Haissig, 1986). Esta elevada formación se traduce en un ennegrecimiento de la base de las estacas, por formación de polifenoles, con la ulterior muerte del material vegetal. Si bien es posible, disminuir la concentración de fenoles con el mantenimiento previo de las plantas en oscuridad (Howard, 1994), este procedimiento no parece adecuado para una producción en gran escala.

En ensayos previos, realizados en el Centro de Ecofisiología Vegetal (CEVEG) se comprobó que la mezcla desarrollada para la propagación de pino por medio de estacas (Hare, 1971) promovía un mejor enraizamiento que el empleo de la auxina IBA sola. Esta mezcla que cuenta con, además de IBA, con el antioxidante 1-fenil-3-metil-pirazol-5-ona, el fungicida KAPTAN y azúcar comercial, dio buen resultado cuando se empleó con estacas extraídas de plantas crecidas en invernáculo (Caso *et al.*, 1993). Sin embargo, siempre se presentaba un número de estacas muertas, con ennegrecimiento de las bases.

Por otra parte, existen referencias que muestran que el agregado de 4-clororesorcinol (4CIR) promovió la formación de raíces adventicias en distintas plantas (Gad *et al.*, 1987; Gad & Ben-Efraim, 1988; Ben-Efraim *et al.*, 1990). Según estos autores, 4CIR actuaría como inhibidor de las polifenol oxidases.

En este trabajo se presentan resultados del enraizamiento de estacas de yerba mate con la mezcla enraizante, con y sin tratamiento previo con una solución de 4CIR.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las plantas dadoras de estacas pertenecían al clon Garruchos de yerba desarrollado en el Establecimiento Las Marías (Gdor. Virasoro, Corrientes). Fueron iniciadas por el tratamiento convencional de ramas separadas de plantas adultas y cultivadas en macetas con suelo de la región. Se desconocía su edad desde el momento en que se propagaron. En el invernáculo, donde alcanzaron a florecer, se mantuvieron a  $20 \pm 5$  °C, día natural sin suplemento de luz. En forma periódica fueron fertilizadas con el compuesto comercial Nitrofoska y pulverizadas con los plaguicidas BENLATE (1 g/L) y AGRIMICINA (0,6 g/L) para cuidar su estado sanitario.

Para los ensayos se emplearon 10-15 trozos de ramas, con 4-5 nudos y con diámetros entre 3-6 mm, que se cortaban de varias plantas. Antes de los tratamientos, se cortaron todas las hojas, salvo la más cercana al extremo apical, de la cual sólo se dejó la mitad.

El ensayo consistió en los tratamientos siguientes:

1. Con la mezcla enraizante, compuesta por 1 % IBA, 1 % PPZ, 10 % KAPTAN, 10 % azúcar comercial y talco hasta 100 g. (Tratamiento ME).
2. Previo al tratamiento con la mezcla enraizante, la mitad de las estacas tuvieron los 2 cm basales sumergidas, durante 2 h, en 100 mM de 4CIR. El resto fue tratado con agua destilada. También se incluyó un control, sin ningún tratamiento.

Para el enraizamiento, las estacas se colocaron en una terrina con perlita esterilizada, a temperatura ambiente, luz difusa y día de 16 h. El día natural se prolongó por iluminación con 2 lámparas HPL, 400 W, colocadas a 1 m por sobre el sustrato. Este se regó antes del inicio del período de observación y cuando fue necesario con una solución Hoagland. Para mantener condiciones de alta

humedad, la terrina se conservaba cubierta por una película de polietileno. El periodo de enraizamiento se extendió durante 45 días. Con plantas en estado vegetativo, el ensayo se repitió dos veces.

Para el análisis de los resultados se evaluaron dos tratamientos: ME y 4CIR + ME. Estos resultados fueron analizados según la prueba de t de Student, considerando dos muestras con varianzas diferentes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos confirman aquellos logrados en ensayos previos (resultados no publicados). En el control sin ningún tratamiento, durante el periodo de enraizamiento no se originaron raíces. Por otra parte, en los dos tratamientos, el porcentaje de estacas vivas y con raíces al final del periodo de enraizamiento fue alto. Los resultados presentados corresponden al momento en que las plantas estaban en estado vegetativo (Febrero-Abril 1993). Para los parámetros medidos en las estacas tratadas (ME y 4CIR + ME), tanto en número de las raíces laterales como en la longitud total del sistema radical, las diferencias entre ambos tratamientos tuvieron significancia estadística (Tabla 1). No así en lo que se refiere al número de raíces principales. Si bien hubo un aumento, no existen dife-

rencias significativas debido a la gran dispersión de los datos. Sin embargo, la mayor longitud del sistema radical favorece una más rápida implantación y una mejor exploración del suelo una vez transplantadas las plantas.

En un ensayo efectuado con plantas que habían comenzado a florecer, los resultados fueron semejantes, aunque hubo una respuesta menor. Esto está de acuerdo con la idea que durante el crecimiento reproductivo es dable encontrar una menor expresión de procesos vegetativos. La formación de raíces es un proceso endergónico, que requiere una buena provisión de sustancias de reserva (Haissig, 1986). Es posible que durante esa etapa, una menor cantidad de sustancias de reserva, influyeran en una menor respuesta.

En algunas estacas del tratamiento 4CIR + ME se observó, entre los 30-35 días de iniciado el periodo de enraizamiento, el crecimiento de un brote. Esto indicaría que la formación de raíces comenzó antes que en las otras estacas. Ello se vio reflejado, también, en la mayor longitud de las raíces. También en algunas estacas del mismo tratamiento se formaron raíces a lo largo del tallo, por arriba del sustrato.

La excelente respuesta lograda, además de ser consecuencia de los tratamientos, puede deberse al hecho que los ensayos se realizaron con plantas que ya habían sido propagadas en forma vegetativa. Estacas enraiza-

**Tabla 1.** Enraizamiento de estacas de yerba mate al cabo de 45 días. Las condiciones en que se efectuó el ensayo están descritas en el texto. Los valores corresponden al promedio de 15 estacas ( $P < 0,05$ ).

*Rooting of cuttings of yerba mate after a period of 45 days. Conditions for rooting were natural day,  $20 \pm 50$  C. Values are averages of 15 cuttings per treatment ( $P < 0,05$ )*

Tratamiento	% de estacas vivas	Número de raíces principales	Número de raíces secundarias	Largo total del sistema radical (mm)
ME	86,7	23,3 $\pm$ 6,9	9,0 $\pm$ 2,7	290,6 $\pm$ 69,2
4CIR + ME	93,3	46,1 $\pm$ 10,6	20,9 $\pm$ 3,7	897,9 $\pm$ 152,1

das de distintas especies demostraron signos de rejuvenecimiento parcial o revigorización fisiológica (cf. Hackett, 1985). Es decir que, aunque las plantas de yerba mate dadoras de las estacas llegaron a florecer en el invernáculo, el clonado previo provocó un aumento de su capacidad de formar raíces adventicias, una característica del estado juvenil (Bonga, 1982).

No se puede dudar del papel esencial que cumplen las auxinas en todo proceso de formación de raíces adventicias (Jarvis, 1986). Sin embargo, en yerba mate como en otras especies, el proceso se vio favorecido por la presencia de otros compuestos en el complejo enraizante

En el corte de los trozos de ramas se producen daños en los tejidos que podrán afectar la capacidad de diferenciar raíces. Como muchas especies leñosas, yerba mate tiene un alto contenido de fenoles. Las heridas provocadas por el corte de las ramas podrán provocar la acumulación de estos compuestos en la base de las estacas. Si bien existen antecedentes del papel promotor de los fenoles como sinergistas en la acción de las auxinas en el enraizamiento, existen otros datos contradictorios (cf. Haissig, 1986). Las polifenoloxidasas (PFO) son enzimas que se encuentran en los tilacoides de los plástidos; sólo se activarían en tejidos senescentes o dañados (Hand, 1994). En las estacas, al provocar la ruptura de las células por el corte, las PFO podrían actuar sobre esa mayor cantidad de fenoles catalizando su polimerización en complejos macromoleculares, insolubles, que obturarían los vasos xilemáticos (Biles & Abelles, 1991). Esto produciría un estrés hídrico fatal en la etapa de la iniciación radical. 4CIR ha sido descrito como un potente inhibidor de estas enzimas (Gad *et al.*, 1987; Gad & Ben-Efraim, 1988). Lo cual explicaría su papel en la formación de raíces adventicias en las estacas. Sin embargo, experimentos de estos mismos autores con estacas de poroto tratadas con IBA + 4CIR demostraron que, ade-

más de inhibir la formación de polifenoles, el 4CIR incrementaba la oxidación del AIA endógeno, permitiendo la organización de los primordios radicales. El IBA aplicado no era afectado por el compuesto (Ben-Efraim *et al.*, 1990).

Otros componentes de la mezcla enraizante también contribuyen a apoyar el efecto de la auxina endógena. La necrosis producida por las heridas puede ser fácilmente atacada por patógenos, colaborando en la muerte del material vegetal. La presencia del fungicida contribuye en el mantenimiento de un mejor estado sanitario de las bases de las estacas tratadas.

El agregado de azúcar está presente en la mezcla recomendada por Hare (1971) y empleada con éxito con *Pinus taeda* (van Buijtenen & Shaw, 1985). En la literatura existen referencias sobre el agregado de sacarosa u otro azúcar en el tratamiento de estacas para enraizar. Un posible efecto citado sería contribuir a mantener el mayor consumo energético requerido por los tejidos donde ha comenzado el proceso de iniciación de los primordios radicales. Sin embargo, existen controversias acerca de este posible papel (Haisig, 1986). Ensayos previos con yerba mate, en los cuales se empleó la mezcla enraizante con y sin azúcar no dieron resultados diferentes (Caso *et al.* 1993).

PPZ es considerado anti-oxidante (Franclet, com. pers.). No se conocen datos en la bibliografía sobre la acción de este compuesto. Sin embargo, puede postularse que en situaciones de estrés hídrico, como es el hecho de separar un trozo de rama y colocarla a enraizar, se produce una activación de las enzimas del estrés oxidativo (Dalton, 1995). Por otra parte, los fenoles liberados durante ese proceso pueden portarse como sustancias pro-oxidantes (Appel, 1993). PPZ podría actuar por medio de algunos de los mecanismos conocidos de desactivación de las enzimas de este tipo de stress (Cadenas, 1995).

Esta misma ME -modificada de la que

desarrolló Hare (1971)- ha resultado eficaz en mejorar el enraizamiento de otras especies, como ser porta-injertos de duraznero (Dessy, com. pers.).

## CONCLUSIONES

Puede concluirse que el empleo de esta secuencia de un pretratamiento con 4CIR seguido por un tratamiento con la mezcla enraizante propuesta, asegurará la producción de un alto número de plantas en un corto lapso (45 días). Un ensayo preliminar realizado en el vivero del Establecimiento Las Marías así lo demostró.

## AGRADECIMIENTOS

El proyecto se realizó con fondos provistos por el CONICET. Se agradece al establecimiento Las Marías por la provisión del material y al Sr. Jorge Galván por el apoyo técnico.

## BIBLIOGRAFÍA

- Appel H. M.** 1993. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. *Journal of Chemical Ecology* 19: 1521-1552
- Ben-Efraim I., A.E. Gad, P. Cohen, P.H. Raymond & P. E. Pilet.** 1990. The effect of 4-chlororesorcinol on the endogenous levels of IAA, ABA and oxidative enzymes in cuttings. *Plant Growth Regulation* 106: 9-97.
- Biles C. L. & F. B. Abeles.** 1991. Xylem sap proteins. *Plant Physiology* 96: 592-601.
- Bonga J. M.** 1982. Vegetative Propagation in Relation to Juvenility, Maturation and Rejuvenation. En: *Tissue Culture in Forestry*. Bonga, J.M. & DJ Durzan, D.J., Eds. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publ., New York. pp. 387-412.
- Cadenas E.** 1995. Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. En Ahmad, S.D., Ed. *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. Chapman & Hall, New York. pp. 1-61.
- Caso O. H.** 1992. Juvenilidad, rejuvenecimiento y propagación vegetativa de las especies leñosas. *Agriscientia IX* (1): 5-16.
- Caso O. H., L. A. Dotta & P. Esteves.** 1993. Propagación clonal de yerba mate (*Ilex paraguariensis* L.). *Actas XX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal*: 310-311.
- Dalton D. A.** 1995. Antioxidants defenses of plants and fungi. En: Ahmad, S. Ed. *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. Chapman & Hall, New York. pp. 1-61.
- Franclet A.** 1979. Rajeunissement des arbres adults en vue de leur propagation vegetative. En: *Micropropagation d'arbres forestiers*, Assoc. Foret-Cellulose, Nangis, France. 3-18.
- Gad A. E., I. Ben-Efraim, M. Yavzur, C. Wieberg & G. Friedman.** 1987. Promotion of rooting and subsequent growth of geranium cuttings by 4-chlororesorcinol. *Israel Journal of Botany* 35: 185-189.
- Gad A. E. & I. Ben-Efraim.** 1988. Promotion of adventitious root formation by 4-chlororesorcinol: A polyphenol oxidase inhibitor. *Plant Growth Regulation* 104: 91-99.
- Hackett W. P.** 1985. Juvenility, Maturation and Rejuvenation in Woody Plants. *Horticultural Review* 7:109-155.
- Haissig B. E.** 1986. Metabolic processes during adventitious rooting of cuttings. En: *New Root Formation in Plants and Cuttings*, M. Jackson, Eds. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, Holland. pp.141-190.
- Hand P.** 1994. Biochemical and Molecular Markers of Cellular Competence for Adventitious Rooting. En: *Biology of Adventitious Root Formation*. T.D. Davis & B.J. Haissig. Eds. Plenum Press, New York. pp. 111-121.
- Hare R. C.** 1971. Factors promoting rooting of tree cuttings, Sixth South. *Forest Physiology Workshop*, Gainesville, Florida. pp. 9-10.
- Howard B. H.** 1994. Manipulating Rooting Potential in Stockplants before Collecting Cuttings. En: *Biology of Adventitious Root Formation*. T.D. Davis & B.J. Haissig, Eds. Plenum Press, New York. pp.123-142.
- Jarvis B. C.** 1986. Endogenous Control of Adventitious Rooting in Non-woody Cuttings. En: *New Root Formation in Plants and Cuttings*. M. Jackson, Eed., Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, Holland. pp.191-222.
- van Buitenen J. P. & D. V. Shaw.** 1985. Vegetative propagation of loblolly pine, *Proceedings International Symposium Nursery Management*, Auburn University, IUFRO. pp.157-166.