

# Medios de Cultivo para el Establecimiento *in vitro* de Explantos de la Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*)<sup>1</sup>

H.Y. Rey\*, O.J. Burtnik\*\*,  
P.A. Sansberro\*\*, L.A. Mroginski\*

## ABSTRACT

*In vitro* regeneration of shoots from axillary buds of "yerba mate" (*Ilex paraguariensis*) was studied under defined nutritional and environmental conditions. Shoot regeneration occurred in all the media tested. Of these, the best medium was composed of 1/4 diluted Murashige and Skoog (MS) basic medium with 3% sucrose. At higher concentrations of basic medium (MS or 1/2 MS), the regeneration of shoots decreased and blackening of the explants increased. The medium 1/2 MS (with 3% sucrose) + 2,4-D (1 mg/l) + zeatin (0.5 mg/l) has been shown to be the best for callus proliferation from leaf explants. Cell suspension cultures were readily established by subculturing callus on 1/4 MS (with 3% sucrose) + 2,4-D (1 mg/l) + 2-iP (0.1 mg/l). The callus differentiated roots but not shoots.

## INTRODUCCION

El árbol de yerba mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire - Aquifoliaceae) se cultiva en el noreste de las provincias argentinas de Misiones y Corrientes, en el sur de Brasil y en Paraguay. Sus hojas se utilizan para elaborar la yerba mate, una infusión estimulante.

La yerba mate se propaga por semillas, pero ello genera una alta variabilidad genética en la descendencia. Por esta razón existe un marcado interés en desarrollar un sistema que permita la propagación vegetativa de genotipos seleccionados de yerba mate. Se han obtenido plantas mediante el enraizamiento de estacas de tallo, pero esta técnica presenta muchas dificultades, entre ellas, el hecho de que los resultados varían año a año (8). También se han hecho los primeros intentos con el uso de injertos con resultados variables (Víctor Jorge Navajas, comunicación comercial).

## COMPENDIO

Se desarrollaron vástagos de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) mediante cultivo *in vitro* de explantos de tallo con una yema axilar. Se obtuvieron mejores resultados empleando el medio básico de Murashige y Skoog (MS) diluido en su concentración de sales a un cuarto, con sacarosa al tres por ciento. El empleo de medios básicos más concentrados (MS y 1/2 MS) disminuyó la brotación de las yemas y aumentó el ennegrecimiento de los explantos. El medio diluido en 1/4 MS (sacarosa al 3%) + 2,4-D (1 mg por litro) + zeatina (0.5 mg por litro) resultó ser el mejor, para la inducción y mantenimiento de callos originales de hojas. Se establecieron suspensiones celulares a partir de callos mediante subcultivos en 1/4 MS + 2,4-D (1 mg por litro) + 2-iP (0.1 mg por litro). Con el cultivo de explantos foliares únicamente se obtuvieron callos, de los cuales se diferenciaron raíces.

En los últimos años se han hecho avances significativos en el desarrollo del cultivo de tejidos como alternativa para la propagación vegetativa, especialmente de especies leñosas (1, 2, 11). Recientemente se ha demostrado la posibilidad de obtener plantas de yerba mate *in vitro*, a partir de ápices caulinares y de segmentos nodales, sin embargo existen aspectos que deben ser investigados con el objeto de mejorar la eficiencia de esta técnica. Uno de éstos es la determinación de un medio de cultivo adecuado (9).

En este trabajo se dan a conocer los medios de cultivo y las normas para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales y explantos de hojas de yerba mate. Asimismo se informa acerca del establecimiento de suspensiones celulares, con el objeto de estudiar las posibilidades de propagar masivamente esta especie por medio de la embriogénesis.

## MATERIALES Y METODOS

Se trabajó con ochenta plantas de yerba mate, *I. paraguariensis* St. Hil. del clon "Garruchos 8". Estas se obtuvieron mediante el enraizamiento de estacas de una planta madre de diez años de edad, que crece en el Establecimiento Las Marías, ubicado en Gobernador Virasoro, Corrientes, Argentina.

Las plantas madres crecieron en macetas en el invernadero, en condiciones de media sombra. Se cultivaron dos tipos de explantos. El primer tipo fueron segmentos de tallo con una yema axilar, tomados de ramas en

<sup>1</sup> Recibido para la publicación el 11 de setiembre de 1989. Trabajo realizado en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), C.C. 209, (3.400) Corrientes, Argentina. Este trabajo fue ejecutado en el marco de un Acuerdo de Trabajos en Colaboración con la Fundación Victoria J. Navajas. Fue parcialmente subsidiado por el plan 665 de CAFPTA. Los autores agradecen a V. Maruñak la confección de la lámina.

\* IBONE - Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), Corrientes, Argentina.

\*\* Establecimiento Las Marías, Corrientes, Argentina.

activo crecimiento que correspondieron a las cinco primeras yemas de cada rama. Los segmentos nodales fueron desinfectados por inmersión en etanol al 70% durante un minuto y luego en una solución de cloro comercial al 2% de NaOCl durante 25 minutos; finalmente se lavaron varias veces con agua destilada estéril. El segundo tipo de explanto estuvo constituido por trozos de lámina foliar de 5 mm<sup>2</sup> provenientes de hojas jóvenes, cercanas al ápice caulinar. Las hojas se lavaron con agua, luego se desinfectaron con una solución de cloro al 0.8% de NaOCl durante diez minutos, y, por último, se lavaron tres veces con agua destilada estéril.

Los explantos fueron cultivados en tubos de vidrio de 12 cm x 2 cm con 10 ml de medio de cultivo esterilizado en autoclave a 1 atm durante 25 minutos.

Los segmentos nodales fueron cultivados en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) (7) en la concentración original, diluido a la mitad (1/2 MS), a un cuarto (1/4 MS) y a un octavo (1/8 MS), así como también en el medio de McCown y Lloyd (5). En todos los casos se empleó sacarosa al 3%; ningún medio contenía sustancias reguladoras del crecimiento.

Los explantos de hoja fueron cultivados en MS, 1/2 MS, ó en 1/4 MS con 3% de sacarosa, suplementado con diferentes concentraciones y combinaciones de ácido indol-acético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cinetina (CIN), benciladenina (BA), zeatina (ZEA) y 2-isopenteniladenina (2-iP). Antes de adjuntar el agar (0.8%), el pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5.8 con KOH, HCl o ambos.

Los explantos cultivados se incubaron en un cuarto climatizado, a una temperatura constante de 27°C + 1°C y un fotoperíodo de 14 horas (10 W/m<sup>2</sup> por lámparas fluorescentes, "Grolux"). Los explantos foliares también se cultivaron en condiciones de oscuridad.

Para el establecimiento de las suspensiones celulares, callos de 45 días de cultivo en 1/4 MS + ANA (1 mg/l) + 2-iP (0.5 mg/l) fueron transferidos a medios líquidos compuestos por 1/4 MS + 2,4-D (1 mg/l) + 2-iP (0.1 mg-l). También se ensayó el medio de McCown y Lloyd (5). De esta manera y luego de varios subcultivos se generaron suspensiones celulares (Fig. 2c) de crecimiento lento y con una alta tendencia de las células a agregarse conformando pequeños callos (1 mm - 2 mm), los que fueron mantenidos a 27°C + 1°C, con 14 h de fotoperíodo (10 W/m<sup>2</sup>) en un agitador orbital a 90 revoluciones por minuto.

Las suspensiones celulares fueron transferidas a cajas de Petri con 1/4 MS + ANA 1 mg/l + 2-iP 0.1 mg/l ó 1/4 MS + ANA 0.1 mg/l + BA 1 mg/l, en las que los callos continuaron su crecimiento.

Los callos obtenidos mediante el cultivo de explantos foliares y los provenientes de cajas de Petri fueron transferidos a medios frescos -solidificados con agar al 0.8% - que contenían 1/4 MS (con 3% de sacarosa) suplementado con varias combinaciones y concentraciones de sustancias reguladoras del crecimiento.

En todos los casos se cultivó un explanto por tubo y se emplearon como mínimo 10 explantos por tratamiento. Los experimentos fueron repetidos tres veces. El crecimiento de los callos fue medido en peso fresco de los mismos al mes de incubados.

## RESULTADOS

### Cultivo de segmentos nodales

Al cabo de 30 días de cultivo, los resultados obtenidos (Fig. 1) revelaron que el porcentaje de explantos ennegrecidos estaba influenciado por el medio de cultivo empleado: En MS fue del 39% y en 1/4 MS se redujo al 10 por ciento.

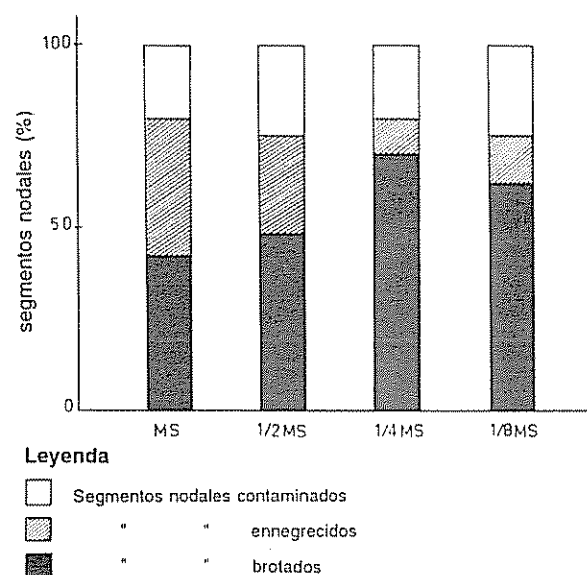


Fig. 1. Efecto de cuatro concentraciones de las sales minerales y vitaminas del medio de Murashige y Skoog sobre el cultivo de segmentos uninodales de yerba mate. En todos los casos se empleó sacarosa al tres por ciento.

Si bien brotaron yemas en los cuatro medios ensayados (Fig. 1), se observaron diferencias en cuanto al porcentaje de los explantos brotados. Los máximos valores fueron obtenidos con 1/4 MS. Además en 1/4 MS los brotes presentaban mayor longitud (2 cm) y las hojas tenían mayor tamaño (0.8 cm), (Fig. 2a). En 1/8 MS los brotes presentaban signos de clorosis.

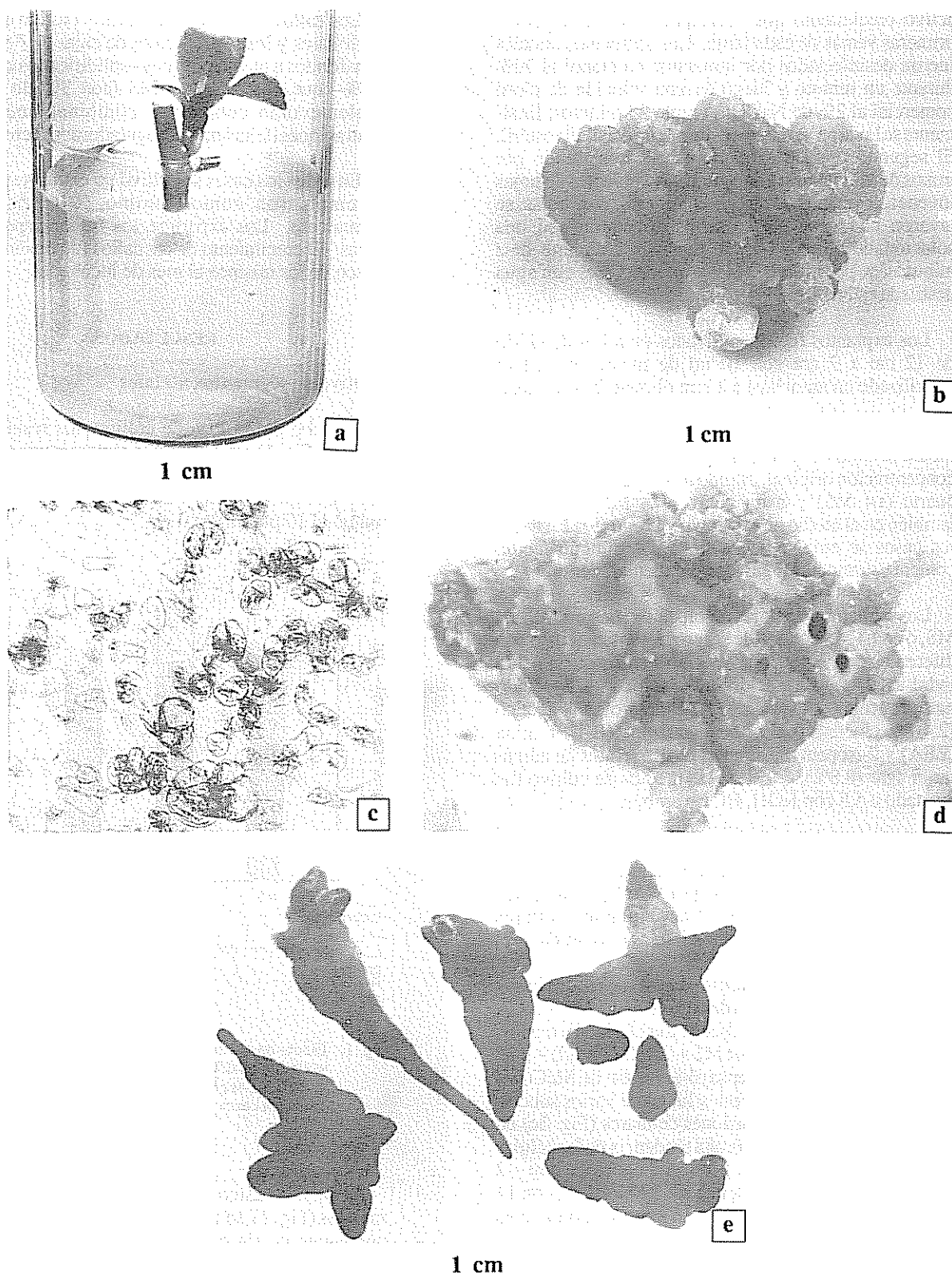


Fig 2. Cultivo de tejidos de yerba mate. a) Brotación de un segmento nodial en un  $1/4$  MS; b) callo obtenido por cultivo de explantos foliares en un  $1/4$  MS + 2,4-D 1 mg/l + 2ip 0.5 mg/l; c) suspensiones celulares (40 x); d) rizogénesis en callos cultivados en  $1/4$  + ANA 1 mg/l + 2iP 0.1 mg/l; e) inducción de raíces a partir de estructuras similares a embriones.

### Inducción de callos a partir de lámina foliar y establecimiento de suspensiones celulares

El procedimiento de desinfección de las hojas resultó satisfactorio, dado que el porcentaje de explantos contaminados no superó el 10 por ciento. Al cabo de dos semanas de incubación se visualizó la formación de callos (Fig. 2b) en la mayoría de los medios ensayados, excepto en los que contenían AIA e AIB (1 mg/l) en combinación con BA (0.5 mg/l), así como también AIB (1 mg/l) + zeatina (0.5 mg/l). Transcurrido un mes de incubación, los cultivos que fueron mantenidos en condiciones de oscuridad manifestaron un ritmo de crecimiento de callos dos veces superior (800 mg de peso fresco), que aquellos incubados en luz (400 mg). Si bien en todas las diluciones del medio se obtuvieron callos, el ritmo de crecimiento fue superior cuando se empleó 1/4 MS. Este medio fue el único que permitió que los callos continuaran creciendo en los posteriores subcultivos.

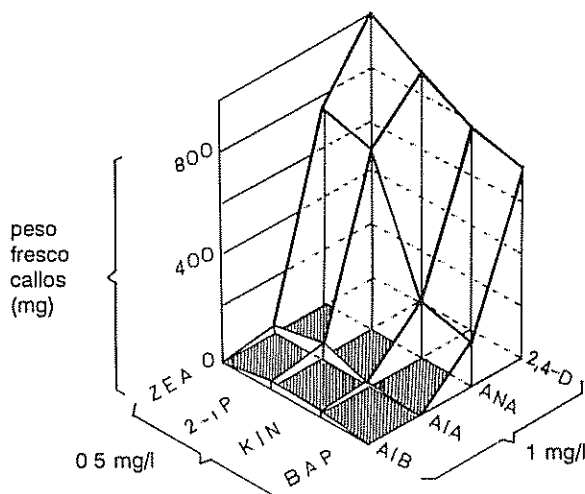


Fig. 3. Efecto de cuatro auxinas y cuatro citocininas suplementadas a 1/4 MS (sacarosa 3%) en el crecimiento de callos originados de explantos de lámina foliar de la yerba mate. Resultados tomados a los 40 días de incubación.

El crecimiento de los callos dependió del tipo y concentración de auxina y citocinina que se adicionó al medio 1/4 MS. En la Fig. 3 se representan los resultados obtenidos con la combinación entre cuatro auxinas y cuatro citocininas. El mayor crecimiento de callos se logró en 1/4 MS + 2,4-D (1 mg/l). Independientemente de la citocinina empleada, los callos de mayor tamaño (1000 mg) se obtuvieron con 2,4-D y ANA; en cambio cuando se utilizaron AIB ó AIA, se obtuvieron callos pequeños (30 mg) en relación con los antes mencionados. En general, el orden decreciente de efec-

tividad de las citocininas empleadas para el logro de callos de buen crecimiento fue: zeatina, 2-isopenteniladenina, cinetina y benciladenina. La mayoría de los callos fueron de consistencia compacta.

### Organogénesis a partir de callos y suspensiones celulares

En varios medios de cultivo se logró un buen crecimiento calloso a través de las sucesivas transferencias. En este aspecto se destacó el medio 1/4 MS + ANA 1 mg/l + 2-iP 0.1 mg por litro. La friabilidad de los callos aumentó en los subcultivos y en ningún caso se pudo apreciar la regeneración de vástagos, aunque especialmente en medios suplementados con 2-isopenteniladenina y, en menor medida, con cinetina hubo un 50% de diferenciación de raíces (Fig. 2d). Asimismo, en los callos y en las suspensiones celulares se desarrollaron estructuras que únicamente brindaron raíces pero no vástagos (Fig. 2e).

### DISCUSION

Los segmentos nodales y los explantos foliares de la yerba mate tienen un comportamiento *in vitro* similar al mostrado por la mayoría de las especies leñosas, pues la implantación de los cultivos puede verse dificultada por la contaminación con hongos, bacterias o ambos. Los explantos de yerba mate han mostrado ser muy exigentes en cuanto a la concentración de las sales minerales y vitaminas del medio de cultivo. La utilización de MS en su formulación original (7) o diluido a la mitad (1/2 MS) se traduce en una disminución de la brotación de los segmentos nodales y en un marcado aumento de segmentos nodales ennegrecidos. Asimismo, MS y 1/2 MS limitan o impiden el crecimiento de los callos generados en explantos foliares. El ennegrecimiento de los explantos está estrechamente correlacionado con la utilización de las concentraciones más altas del medio básico, que evidentemente resultan tóxicas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otras especies leñosas, los cuales han demostrado que el elevado contenido salino de la formulación original del medio MS afecta la supervivencia de los cultivos de ellas (6). En cambio, el empleo del medio 1/4 MS resultó satisfactorio para el establecimiento y brotación de los segmentos nodales en relación con el medio de McCown y Lloyd (5), como asimismo para la inducción y el mantenimiento del crecimiento calloso (6).

El establecimiento y brotación *in vitro* de los segmentos nodales de la yerba mate se obtienen con 1/4 MS (sacarosa al 3%), desprovisto de reguladores de crecimiento. En cambio, para la inducción de callos a

partir de explantos foliares, se requiere la adición al medio 1/4 MS (sacarosa al 3%) de una auxina y una citocinina. Los mejores resultados se logran con una combinación entre 2,4-D (1 mg/l) y zeatina (0.5 mg/l). La incubación de los cultivos en condiciones de oscuridad favorece notoriamente el crecimiento inicial de los callos y el establecimiento de suspensiones celulares (3, 4, 11).

La falta de regeneración de plantas a partir de callos de los explantos foliares limita la utilización de este sistema en los planes de fitomejoramiento. Sin embargo, la diferenciación de estructuras que únicamente brindan raíces, es un aliciente para abordar nuevas investigaciones que esclarezcan los factores que regulan la organogénesis y la embriogénesis *in vitro* de la yerba mate.

#### LITERATURA CITADA

1. CHALUPA, V. 1987. European hardwoods. In Cell and Tissue Culture in Forestry. J.M. Bonga, D.J. Durzan (Eds). Boston, Martinus Nijhoff Publishers. v. 3, p. 224-246.
2. DUNSTAN, D.I.; THORPE, I.A. 1986. Regeneration in forest trees. In Cell and Somatic Cell Genetics of Plants I.K. Vasil (Ed). Orlando, Academic Press. v. 3, p. 223-241.
3. FERREIRA, A.G.; HU, C.Y. 1984. Influencia da luz na embriogénesis tardía de *Ilex*-culturas *in vitro*. In Congreso Nacional de Botánica (34.) Anais. Comunicacocs. Porte Alegre, Bra. v.2, p. 441-449.
4. HU, C.Y. 1976. Light-mediated inhibition of *in vitro* development of rudimentary embryos of *Ilex opaca*. American Journal of Botany 63(5):651-656.
5. McCOWN, B.H.; LLOYD, G. 1981. Woody plant medium: A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. HortScience 16:453.
6. McCOWN, B.H.; SELLMER, J.C. 1987. General media and vessels suitable for woody plant culture. In Cell and Tissue Culture in Forestry. J.M. Bonga, D.J. Durzan (Eds). Boston, Martinus Nijhoff Publishers. v. 1, p. 4-16.
7. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15:473-497.
8. PRAT KRICUM, S.D. 1981. Selección clonal en té y yerba mate. In Jornadas de Genética Aplicada del Nordeste Argentino. Actas. p. 71-77.
9. REY, H.Y.; MROGINSKI, L.A. 1988. Regeneración de plantas de yerba mate *Ilex paraguariensis* por cultivo *in vitro* de ápices caulinares y de segmentos nodales. Phytion. Revista Internacional de Botánica Experimental 48:139-145.
10. SONDHAL, M.R.; MONACO, L.C.; SHARP, W.R. 1981. *In vitro* methods applied to coffee. In Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture. T.A. Thorpe (Ed.). New York, Academic Press. p. 325-347.
11. TULECKE, W. 1987. Somatic embryogenesis in woody perennials. In Cell and Tissue Culture in Forestry. J.M. Bonga, D.J. Durzan (Eds). Boston, Martinus Nijhoff Publishers. v. 2, p. 61-91.